



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO  
PROSTŘEDÍ**

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

**LÉČIVA A MOŽNOST JEJICH ELIMINACE Z ODPADNÍCH  
VOD**

DRUGS AND POSSIBILITY OF THEIR ELIMINATION IN SEWAGE WATERS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Zuzana Křivánková**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**

**BRNO 2017**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1053/2016  
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Studentka: **Zuzana Křivánková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název bakalářské práce:

Léčiva a možnost jejich eliminace z odpadních vod

### Zadání bakalářské práce:

1. Na základě studia literatury bude zpracována literární rešerše.
2. Na jejím podkladě budou vybrány analyty a metody pro jejich stanovení.
3. Vhodný pracovní postup bude ověřen pilotní studií.
4. Ověřená metoda bude použita pro analýzu reálných vzorků odpadní vody.
5. Zhodnotit a interpretovat získané výsledky.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Zuzana Křivánková  
student(ka)

-----  
prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Předložená bakalářská práce se věnuje problematice vlivu rostoucí spotřeby léčiv na složky životního prostředí. V České republice jsou v současnosti stále více předepisována a pacienti užívána léčiva na bázi benzodiazepinových derivátů. Sledovanými zástupci byly v této studii alprazolam, bromazepam, diazepam a oxazepam, jejichž indikacemi jsou poruchy spánku, psychiatrická onemocnění, avšak také celková anestezie nebo léčba epilepsie. Přítomnost těchto léčiv bývá opakovaně potvrzována v odpadních a povrchových vodách na celém území Evropy a jiných vyspělých zemí, ačkoliv jsou známy jejich negativní účinky na vodní ekosystém. Cílem této práce je optimalizace metod pro stanovení zvolených léčiv v odpadních vodách odebraných v Brně a okolí. Rovněž byla vyhodnocena rizika pro vodní ekosystém související s přítomností léčiv v cílových matricích, kterými byly odpadní vody z čistíren odpadních vod (ČOV) Brno – Modřice a ze dvou dalších obcí z Jihomoravského kraje. Byly sledovány koncentrace léčiv na přítoku a na odtoku. Analyty byly z matric izolovány pomocí extrakce tuhou fází (SPE) a kvantifikovány ultraúčinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC) s detekcí pomocí diodového pole (DAD).

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with issue of increasing consumption of pharmaceuticals and its influence on the environment. In the Czech Republic the pharmaceuticals from the benzodiazepine group are still widely prescribed and used by patients. There was tracked four representatives of this group alprazolam, bromazepam, diazepam and oxazepam which are indicated for therapy of insomnia, psychiatric diseases but also like a general anesthetics or antiepileptics. Presence of this pharmaceuticals is being repeatedly confirmed in wastewaters and surface waters throughout the whole Europe and other developed countries even though their negative effects for the water ecosystem are known. The target of this thesis is to optimize the methods for determination of chosen pharmaceuticals in wastewaters in Brno and surrounded area. There was also evaluated the hazard level for water ecosystem related to the presence of pharmaceuticals in target matrices which were the wastewaters from wastewater treatment plants in towns Brno – Modřice and from two other towns in south Moravia. Concentrations of the pharmaceuticals were tracked in the influents and effluents. The analytes were isolated from the matrices by solid-phase extraction (SPE) and quantified by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) with detection by the diode array (DAD).

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Benzodiazepiny, odpadní voda, extrakce tuhou fází, ultraúčinná kapalinová chromatografie, životní prostředí

## **KEYWORDS**

Benzodiazepines, wastewater, solid-phase extraction, ultra-high performance liquid chromatography, environment

KŘIVÁNKOVÁ, Z. *Léčiva a možnost jejich eliminace z odpadních vod*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 60 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda vyjádřila poděkování své vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za velkou trpělivost a vstřícnost při realizaci této práce. Velký dík patří rovněž odborné konzultantce, Ing. Pavlíně Landové, za poskytnutí cenných rad a zkušeností a především za její nesmírnou podporu a spolupráci při mých zdarech i nezdarech během řešení jednotlivých experimentů.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1	Benzodiazepiny .....	9
2.1.1	Chemické vlastnosti .....	9
2.1.2	Farmakologické vlastnosti a statistiky .....	11
2.1.3	Toxikologie benzodiazepinů .....	12
2.1.4	Metabolizace benzodiazepinů v lidském organismu.....	13
2.2	Léčiva v životním prostředí .....	15
2.3	Vlastnosti odpadních vod.....	16
2.3.1	Spláskové vody .....	16
2.3.2	Průmyslové vody.....	16
2.3.3	Městské vody.....	17
2.4	Čistírny odpadních vod .....	17
2.4.1	Předčištění a mechanické čištění.....	17
2.4.2	Biologické čištění .....	19
2.4.3	Zpracování čistírenských kalů.....	20
2.4.4	ČOV Brno - Modřice.....	21
2.4.5	ČOV A.....	23
2.4.6	ČOV B.....	23
2.4.7	Možnosti eliminace benzodiazepinů z odpadních vod.....	23
2.5	Postup analýzy léčiv obsažených v odpadních vodách.....	24
2.5.1	Vzorkování odpadních vod .....	24
2.5.2	Extrakce tuhou fází (SPE) .....	25
2.5.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	29
2.6	Matriční efekt.....	35
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
3.1	Seznam použitých přístrojů a pomůcek .....	36
3.2	Použitý software.....	36
3.3	Seznam použitých chemikálií a standardů .....	36

3.4	Seznam analyzovaných vzorků .....	37
3.5	Postup analýzy .....	37
3.5.1	Odběr vzorků.....	37
3.5.2	Extrakce tuhou fází (SPE) .....	37
3.5.3	Kvantitativní stanovení pomocí UHPLC .....	38
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	39
4.1	Optimalizace systému UHPLC .....	39
4.1.1	Příprava zásobních roztoků .....	39
4.1.2	Základní HPLC charakteristiky analytů .....	40
4.1.3	Chromatografické podmínky.....	41
4.1.4	Kalibrace .....	41
4.1.5	Limit detekce a limit kvantifikace.....	43
4.2	Extrakce tuhou fází (SPE).....	44
4.2.1	Výběr kolonek a promývacího a elučního činidla.....	44
4.2.2	Optimalizace promytí a eluce.....	45
4.2.3	Výtěžnost metody.....	46
4.3	Měření reálných vzorků .....	48
4.3.1	Obsah léčiv ve vzorcích odpadních vod.....	49
4.3.2	Vyhodnocení rizik .....	51
5	ZÁVĚR .....	53
6	SEZNAM LITERATURY .....	55
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	60

# 1 ÚVOD

V České republice je ročně pacientům aplikováno velké množství léčiv patřících do různých skupin. Jejich spotřeba u nás každoročně stoupá; podobně je tomu i v jiných zemích Evropy, potažmo celého světa. Léčivé látky a jejich metabolity se tak dostávají do odpadních vod a odtud pronikají do životního prostředí, neboť žádná čistírna odpadních vod nedokáže zcela eliminovat jejich přítomnost v odpadních vodách.

Rezidua léčivých látek a jejich metabolitů bývají opakovaně zjišťována v povrchových vodách, sedimentech i v půdách, a to řádově v koncentracích  $\text{ng.l}^{-1}$  –  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . V současné době se provádí velké množství studií zaměřených na to, jakým způsobem ovlivňují tyto látky životní prostředí a jak narušují biologickou rovnováhu v přírodě. Neméně záslužná je rovněž snaha mnoha výzkumníků a vodohospodářů nalézt vhodnější technologické procesy, které by mohly zajistit důkladnější a efektivnější zamezování úniku léčiv do životního prostředí. U některých typů farmak již byly prokázány negativní účinky na živé organismy, a to na celé jejich populace, zejména na vodní faunu.

Každý léčivý přípravek obsahuje určitou účinnou léčivou látku, případně jejich směs. Léčivá látka má jednoznačně definovanou chemickou strukturu, od které se odvíjejí její biochemické vlastnosti a účinky na lidský organismus. Mnohé z léčivých látek nebo jejich metabolitů však rovněž vykazují biochemické účinky na jiné živé organismy. Tyto vlivy jsou však také závislé na formě, v jaké se daná účinná látka do životního prostředí dostává, v jaké formě tam případně přetrvává a jaká je její biologická dostupnost pro daný organismus.

Z těchto důvodů veřejnost i zákonodárci požadují pravdivé informace o možnostech sledování obsahu léčivých látek v životním prostředí a v možnosti jejich eliminace nebo omezení.

V teoretické části bakalářské práce je popsána chemická struktura sledovaných léčiv, jejich reaktivita a indikace, včetně biochemického působení na živé organismy. Kromě toho je tu pojednáno o vlastnostech odpadních vod, funkci čistíren odpadních vod (ČOV) a o možnostech stanovení obsahu léčiv v odpadních vodách.

Experimentální část práce byla zaměřena na stanovení obsahu vybraných léčiv ze skupiny benzodiazepinů, tj. alprazolamu, bromazepamu, diazepamu a oxazepamu v odpadních vodách. Konkrétní sledovaná léčiva byla vybrána na základě údajů o aplikaci těchto léčiv v Jihomoravském kraji. Vzorby byly odebrány ve třech čistírnách odpadních vod, v Brně - Modřicích, a to na přítoku a také po jejím vyčištění, na odtoku. Rovněž byla odebrána odpadní voda z ČOV v obcích A a B, a to kromě přítoku a odtoku také v aktivační nádrži; jedná se o obce situované v okrese Brno – venkov. Pracovníci těchto ČOV požadovali, aby v závěrečné práci nebyla uvedena přesná lokalita.

Kromě toho byla také posuzována efektivita vybraných ČOV pro odstraňování výše specifikovaných látek z odpadních vod. Při samotném procesu stanovení musely být z důvodu předpokládaných nízkých koncentrací analytů použity metody pro zkoncentrování získaného

extraktu a teprve následně bylo přistoupeno k jejich identifikaci a ke kvantitativnímu stanovení.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

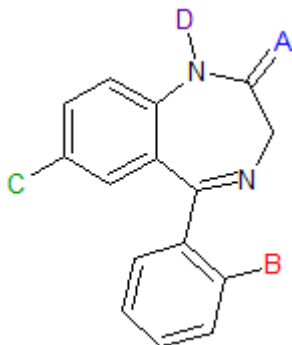
Na základě informací ze Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL) a z Veterinární a farmaceutické univerzity Brno (VFU) o četnosti aplikací léčiv pacientům v Brně a okolí byla pro posouzení vybrána čtyři léčiva ze skupiny benzodiazepinů: alprazolam, bromazepam, diazepam a oxazepam.

### 2.1 Benzodiazepiny

Benzodiazepiny patří mezi psychoaktivní látky, které jsou předepisované zejména v psychiatrii. Patří do skupiny psycholeptik. Nejčastějšími indikacemi pro užívání těchto léčiv jsou úzkostné a panické poruchy, nespavost, křeče, apod. Mají sedativní, anxiolytické a myorelaxační účinky. Často bývají zneužívány jako drogy a při jejich dlouhodobé aplikaci hrozí riziko závislosti.

#### 2.1.1 Chemické vlastnosti

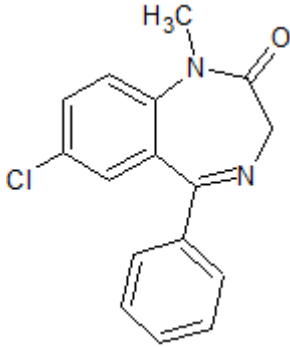
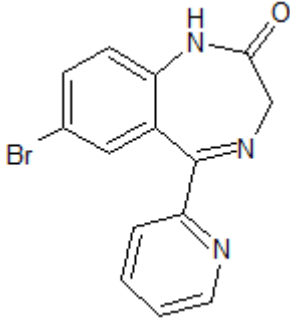
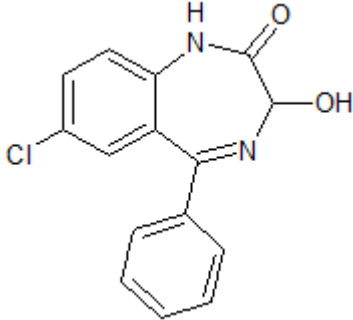
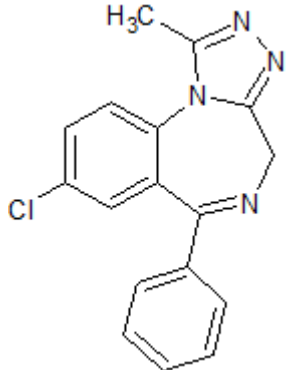
Chemická struktura je založena na propojení jednoho diazepinového kruhu se dvěma benzenovými jádry. V závislosti na tom, o které léčivo se přesně jedná, má molekula na různých místech připojeny další substituenty, které dodávají každé z těchto molekul unikátní chemické a farmakologické vlastnosti.



**Obr. č. 1:** Obecná struktura benzodiazepinů; A – D symbolizují různé funkční skupiny

Všechny studované benzodiazepiny se za normálních podmínek vyskytují jako pevné látky, jsou stabilní, netěkavé, bez zápachu. Vykazují značnou lipofilitu (hodnoty  $K_{OW}$  jsou uvedeny v tabulce - Tabulka 1), ve vodě jsou prakticky nerozpustné, avšak dobře se rozpouštějí v methanolu, ethanolu a v řadě dalších organických rozpouštědel [12] – [15].

**Tabulka 1:** Chemické vlastnosti studovaných léčiv [12] – [15]

Léčivá látka	Struktura	Sumární vzorec	Molární hmotnost [g/mol]	log $K_{ow}$
<b>Diazepam</b> (CAS 439-14-5)		$C_{16}H_{13}ClN_2O$	284,7	2,82
<b>Bromazepam</b> (CAS 1812-30-2)		$C_{14}H_{10}BrN_3O$	316,2	2,05
<b>Oxazepam</b> (CAS 604-75-1)		$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$	286,7	2,24
<b>Alprazolam</b> (CAS 28981-97-7)		$C_{17}H_{13}ClN_4$	308,8	2,12

### 2.1.2 Farmakologické vlastnosti a statistiky

Všechna registrovaná léčiva na světě jsou prostřednictvím Světové zdravotnické organizace (WHO) klasifikována do anatomicko-terapeuticko-chemických (ATC) skupin podle cíle působení, a to z hlediska anatomie těla, indikace a chemické struktury. Benzodiazepiny patří do skupiny N05BA, kde „N“ je anatomická kategorie *Nervový systém*, „05“ indikační skupina v rámci této kategorie *Psycholeptika*, „B“ indikační podskupina *Anxiolytika* a „A“ označuje chemickou skupinu *Benzodiazepinové deriváty* [16].

V České republice se zabývá registrací nových léčiv a kontrolou trhu s léčivy, aktuálně zaregistrovanými, Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL). Tato instituce rovněž zveřejňuje čtvrtletní zprávy o dodávkách léčiv do lékáren a provozoven oprávněných k prodeji léčiv a také zprávy o výdeji příslušných léčiv pacientům. V těchto zprávách mimo jiné uvádí množství léčiv dodaných do lékáren nebo vydaných v jednotkách „Definované denní dávky (DDD)“, což je průměrná udržovací dávka daného léčiva pro průměrného uživatele na jeden den. Například Diazepam-Slovakofarma® je v ČR distribuován nejčastěji ve formě tablet o obsahu diazepamu 10 mg/tbl. a 5 mg/tbl., přičemž jako 1 DDD je podle SÚKL uváděno množství 10 mg. Protože většina léčiv je distribuována ve velkém množství, je přehlednější uvádět DDD/1000 obyvatel/den, což je roční (popř. čtvrtletní) ukazatel vypočítaný z počtu DDD dodaných do lékáren (popř. vydaných<sup>1</sup>) ve všech formách distribuce v daném roce, dělený počtem obyvatel v ČR v daném roce, násobený 1000 a dělený počtem dní v roce. Tento způsob vyjádření nám ukazuje, kolik DDD bylo přibližně spotřebováno tisíci obyvateli ČR za jeden den v daném roce a slouží k porovnání míry užívání léčiv v populaci [17].

---

<sup>1</sup> Pro rok 2016 uvádí SÚKL kompletní statistiky pouze o *dodávkách* léčiv do lékáren a dalších institucí oprávněných k prodeji léčiv v ČR. Statistiky o *výdeji* léčiv nezahrnují všechna výdejní místa. Na základě předpokladu, že lékárenská a zdravotnická zařízení reagují na tržní poptávku, nebyl předpokládán signifikantní rozdíl mezi DDD dodanými a DDD vydanými. Proto byly použity hodnoty DDD *dodávky* léčiv (nikoliv výdeje), které byly z výše uvedených důvodů považovány za spolehlivější.

**Tabulka 2:** Přehled farmakologických vlastností studovaných léčiv [17] – DDD/1000 obyvatel/den je průměrnou hodnotou za celý rok 2016 [16]. Indikace byly zjištěny podle příslušných příbalových letáků [18] – [21]

Léčivá látka	Obchodní název přípravku (v ČR)	Skupina ATC	DDD [mg]	DDD/1000 obyvatel/den <sup>1</sup>	Indikace
Alprazolam	Neurol®, Xanax®, Frontin®, aj.	N05BA12	1	6,70	Úzkost, panické poruchy, aj.
Bromazepam	Lexaurin®	N05BA08	10	1,66	Úzkost, aj.
Diazepam	Diazepam-Slovakofarma®	N05BA01	10	1,95	Úzkost, svalové napětí, křeče, aj.
Oxazepam	Oxazepam Léčiva	N05BA04	50	0,51	Nervozita, úzkost, neklid, nespavost, aj.

### 2.1.3 Toxikologie benzodiazepinů

Toxikologie je definována jako nauka o jedech, přičemž jako jed lze označit každou sloučeninu, která vyvolává nežádoucí změny biologických funkcí živých organismů; tyto účinky závisejí především na dávce.

Účinky chemických látek a léčiv bývají dokazovány experimentálně nebo predikčními metodami na základě vztahu míry a typu účinku látky v závislosti na její struktuře; k tomu se využívá klasifikační model QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships). Stejná látka způsobí většinou rozdílné účinky při různých dávkách na různé druhy organismů, a to v závislosti na funkci jejich metabolického systému. Proto se některé toxikologické vlastnosti látek stanovují pro určitý druh organismu a těmi například jsou:

- LD (Letal Dose, letální dávka): Dávka, která usmrtí určité procento sledovaných subjektů, LD50 pro usmrcení 50 %, atd.
- ED (Effective Dose, efektivní dávka): Dávka, která způsobí vyvolání patrného účinku u určitého procenta sledovaných subjektů, ED50 pro vyvolání účinku u 50 %, atd.

Důležitými ukazateli v toxikologii jsou i takové, které je možno stanovit jak pro jednotlivé druhy organismů, tak pro soubor více druhů organismů nebo pro celý ekosystém. Mezi takové patří například:

- NOED (No Observable Effect Dose, dávka nevykazující pozorovatelný účinek): je to taková dávka, jejíž podání prokazatelně nevyvolá žádné účinky u žádného ze sledovaných subjektů.
- PNEC (Predicted No Effect Concentration, predikovaná koncentrace nevyvolávající žádný účinek): je to predikovaná koncentrace látky v daném ekosystému, která

nevyvolá žádný účinek u žádného ze sledovaných subjektů. Její hodnotu lze stanovit experimentálně sledováním rozmanitého souboru pokusných subjektů nebo metodou QSAR.

Pro vyhodnocení rizika spojeného s výskytem polutantů v ekosystému se používá hodnota HQ (Hazard Quotient, koeficient rizika), což je poměr mezi stanovenou koncentrací látky v určitém vzorku nebo ekosystému a PNEC nebo NOEC. Je zřejmé, že  $HQ > 1$  poukazuje na možnou přítomnost rizika.

Rozlišujeme rovněž toxicitu akutní, která nastává po krátkém časovém intervalu expozice (projeví se většinou po expozici vyšším dávkám) a toxicitu chronickou, která nastává po dlouhodobější expozici (ta se může projevit i při nižších dávkách) [9].

#### **2.1.3.1 Toxikologické ukazatele benzodiazepinů**

Pro diazepam ve vodním ekosystému byla v literatuře nalezena hodnota PNEC 2,0 µg/l, pro oxazepam 4,3 µg/l. Podobná data však nebyla v literatuře publikována pro alprazolam ani bromazepam [32].

#### **2.1.3.2 Negativní účinky na člověka**

Mezi nežádoucí účinky benzodiazepinů při jejich užívání patří svalová slabost, únava, poruchy paměti a řeči, aj. Tyto projevy mohou být důsledkem příjmu příliš vysoké dávky léčiva, avšak mohou se vyskytnout i při správném dávkování, protože zmíněné účinky jsou přímými důsledky útlumu CNS [9], [18] – [21].

Již v roce 1975 byl zjištěn významný vztah mezi užíváním řady benzodiazepinů (diazepamu, oxazepamu, nitrazepamu a chlórdiazepoxidu) matkami v těhotenství a výskytem rozštěpu patra u jejich narozených dětí. Proto je užívání benzodiazepinů kontraindikováno v prvním trimestru těhotenství, kdy je vyvíjející se plod nejvíce náchylný ke vzniku vývojových vad [27].

#### **2.1.3.3 Negativní účinky na ostatní živé organismy**

Podávání vysokých dávek oxazepamu skupině krys po dobu 2 let způsobilo zkracování doby jejich života s rostoucí dávkou; s rostoucí dávkou rovněž klesala jejich tělesná hmotnost. Po smrti byla těla krys podrobena pitvě, přičemž bylo zjištěno, že krysy, které přijímaly oxazepam, měly proti kontrolní skupině signifikantně zvýšený výskyt poškození gastrointestinálního traktu (GIT), včetně žaludečních vředů a chronického zánětu GIT, dále prekancerózní a jinépatologické změny v ledvinové tkáni [34].

Podávání šesti zástupců benzodiazepinů (chlórdiazepoxidu, diazepamu, oxazepamu, prazepamu, flurazepamu, and nitrazepamu) párům laboratorních myší způsobilo signifikantní pokles jejich ochoty k páření a narozená mláďata měla velmi nízkou porodní hmotnost [38].

#### **2.1.4 Metabolizace benzodiazepinů v lidském organismu**

Metabolickými změnami léčiv v organismu od jejich podání až po vyloučení (tzv. osud látky v organismu) se zabývá obor *farmakokinetika* [2]. Jsou rozlišovány tyto fáze:

- *Absorpce (vstřebávání)*

Zahrnuje přestup léčiva do krevní plasmy přes střevní stěnu, sliznici, apod. S tímto pojmem se pojí termín *biologická dostupnost* (také *biodostupnost*), což je podíl množství léčiva podaného a léčiva vstřebaného, které se vyjadřuje v procentech. Závisí na způsobu podání, které může být perorální, intramuskulární, rektální, apod. Bylo zjištěno, že při intravenózním podání je biodostupnost 100 %. Rovněž závisí na degradaci léčiva před započítáním absorpce, na lékové formě, aj. Podíl nevstřebaného léčiva je vyloučen z těla vesměs v nezměněné formě [1].

- *Distribuce*

Zahrnuje transport léčiva z krve do tkání přes tkáňové bariéry [1]. Benzodiazepiny jsou jako lipofilní látky transportovány v krevním řečišti příslušnými transportními proteiny a díky své lipofilitě snadno prostupují hematoencefalitickou bariérou, což zvyšuje míru jejich účinků na CNS [34].

- *Metabolismus (biotransformace)*

Biotransformaci léčiv zajišťuje v těle řada enzymů; důsledkem jejich působení je změna chemické struktury metabolizované látky (metabolitu). Jejím cílem je převod látky přijaté v biologicky neaktivní formě na formu aktivní, která vykazuje farmakologický účinek, nebo naopak degradace farmakologicky aktivní látky na látku neaktivní, která je posléze vyloučena z organismu. Obecně jsou lipofilní léčiva v těle přeměněna na hydrofilní, která jsou snáze vylučitelná močí [1].

Bylo zjištěno, že diazepam je v lidském těle metabolizován kromě jiného na polárnější oxazepam (minoritní metabolit) a v této formě je zčásti i vylučován z těla [22], [23].

- *Eliminace (vyloučení)*

Po transformaci léčiva na polární metabolit je tento metabolit obvykle navázán na některý z endogenních produktů přirozeného metabolismu. Tento konjugát, obvykle dobře rozpustný v tělních tekutinách, bývá vyloučen močí, stolicí nebo potem. Při kvantitativním popisu eliminace látek z těla se používá termín *poločas eliminace*, což je čas, za který se vyloučí polovina množství přítomné látky obsažené v těle [1].

Stejným způsobem však mohou být některé sloučeniny eliminovány i ve formě výchozí látky, např. alprazolam je při orálním podání přibližně z 80 % vylučován ledvinami z těla v nezměněné podobě [33].

## **2.2 Léčiva v životním prostředí**

Léčiva vstupují do životního prostředí nejčastěji prostřednictvím odpadních vod během jejich výroby, dále jako průmyslový odpad, případně během spotřeby v medicíně, a to jak humánní, tak i veterinární. Odpadní vody však z velké části procházejí procesem čištění v ČOV, kde může být množství léčiv obsažených v odpadní vodě do určité míry sníženo. Horším případem se zdá být nevhodná likvidace nespotřebovaných léčiv obyvatelstvem, která se často uskutečňuje vyhazováním do komunálního odpadu (viz Tabulka 3). Odtud se léčiva dostávají na skládku, kde jsou vystavena přírodním vlivům, jakými jsou například srážky nebo vítr, které mohou zapříčinit rozptýlení těchto látek do okolí a následně jejich přestup mezi složkami životního prostředí. To platí i pro biotu, přičemž tato xenobiotika (látky tělu cizí) mohou mít negativní vliv na metabolismus živých organismů.

**Tabulka 3:** Způsoby likvidace nespotřebovaných léčiv obyvatelstvem v různých zemích zjištěné na základě písemných, osobních či telefonických dotazníků [24]

Země	Toaleta, umyvadlo	Popelnice	Vrácení do lékárny	Ostatní
USA (2009)	28 %	45 %	6 %	5 % (sklad nebezpečného odpadu) 12 % (ponechání doma) 4 % (nespecifikováno)
Nový Zéland (2009), tekuté přípravky	55 %	24 %	17 %	0,7 % (spálení nebo nespecifikováno)
Nový Zéland (2009), tablety a kapsle	19 %	51 %	24 %	2,4 % spálení nebo nespecifikováno)
Švédsko (2007)	0 %	3 %	43 %	55 % (ponechání doma)
Litva (2007)	8 %	89 %	3 %	2 % (spálení)
Velká Británie (2005)	11,5 %	63,2 %	21,8 %	3,5 % (jiné skladovací zařízení)
Nizozemí (1996)	3 %	9 %	58 %	16 % (chemický odpad) 6 % (ponechání doma)

## 2.3 Vlastnosti odpadních vod

Odpadními vodami se rozumí takové vody, které byly použity v městských nebo průmyslových oblastech k různým účelům. Tyto vody mají po použití změněné složení, tzn. i jakost, a proto nemohou být dále využity ani vypuštěny do povrchových vod, dokud nedojde k jejich úpravě v čistírnách odpadních vod (ČOV). Podle místa a předchozího účelu použití vod rozdělujeme odpadní vody na vody *splaškové*, *průmyslové* a *městské*. Jednotlivé typy odpadních vod se liší svým složením; kromě toho vyžadují i jiné nakládání [4].

### 2.3.1 Splaškové vody

Splaškové vody jsou definovány jako odpadní vody přitékající zejména z obytných domů, bytů a z obecné občanské vybavenosti (školy, restaurace, apod.), mající obdobné složení jako vody z domácností. Jedná se převážně o pitnou vodu odebíranou obyvatelstvem, která byla použita k účelům osobní hygieny, vaření, mytí, úklidu a k jiným úkonům běžné denní potřeby člověka. Ve významných koncentracích se v těchto vodách vyskytují látky typu biologického odpadu, dále organické látky, anionaktivní a kationaktivní tenzidy, případně ve velmi nízkých koncentracích rovněž léčiva, která jsou obyvatelstvem užívána; obsaženy mohou být i jejich metabolity. Splaškové vody jsou obvykle vypouštěny přímo do veřejné kanalizace [4].

### 2.3.2 Průmyslové vody

Průmyslové odpadní vody jsou takové, které byly použity pro průmyslové účely (včetně vod chladicích) a jejich vlastnosti byly během použití natolik změněny, že pro daný proces již nejsou znovu použitelné. Patří mezi nětaké odpadní vody ze zemědělství. Mají rozmanité



složení, jejich znečištění může být značné a často musejí být nejprve podrobeny čištění v samostatných průmyslových ČOV, které jsou součástí těchto průmyslových zařízení, aby bylo dosaženo splnění podmínek pro vypouštění do veřejné kanalizace [4].

### 2.3.3 Městské vody

Městské odpadní vody jsou směsí odpadních vod splaškových a průmyslových. Jejich složení se liší podle toho, zda se jedná o obec s převahou domácností a prvků občanské vybavenosti, nebo průmyslově založenou obec. Městské odpadní vody jsou vedeny veřejnou kanalizační sítí do ČOV [4].

## 2.4 Čistírny odpadních vod

Čistírny odpadních vod jsou technologická zařízení, ve kterých se shromažďují všechny odpadní vody, a to za účelem odstranění nebezpečných chemických látek před dalším nakládáním s těmito vodami, čímž je zpravidla vypouštění vod do recipientu (přírodních vod). Vyčištěná odpadní voda mířící do recipientu je průběžně podrobována chemické analýze, zejména jsou sledovány ukazatelé  $\text{CHSK}_{\text{Cr}}$ ,  $\text{BSK}_5$ ,  $\text{N}_{\text{celk}}$ ,  $\text{P}_{\text{celk}}$ .

Kapacita ČOV se uvádí v jednotkách EO (Ekvivalentní obyvatel). Tato jednotka vyjadřuje spotřebu průměrného člověka denně produkujícího 150 litrů odpadních vod a organické znečištění odpovídající 60 g  $\text{BSK}_5$  [4].

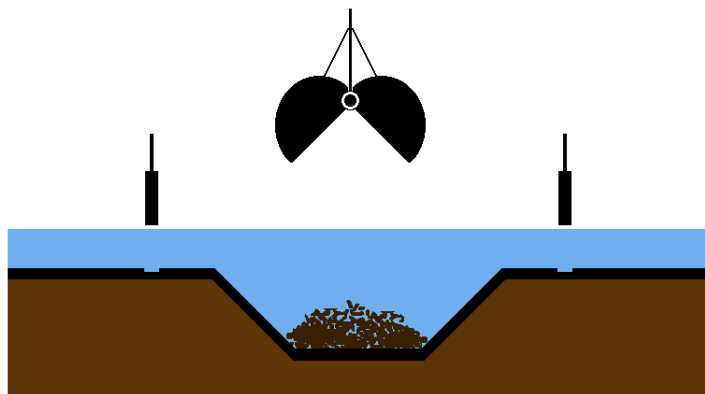
Odpadní vody obsahují znečišťující chemické látky a mechanické nečistoty velmi rozličného charakteru, a proto je v ČOV zařazeno za sebou několik způsobů čištění vod, kterými odpadní voda postupně prochází. Obecně bývá zařazen stupeň předčištění a mechanického čištění, kde dochází k oddělení mechanických nečistot ze surové vody. Při následném biologickém čištění potom dochází k biologickému odbourání chemických látek pomocí aktivovaného kalu obsahujícího živé organismy. V některých ČOV je navíc prováděno ještě chemické dočištění [3].

### 2.4.1 Předčištění a mechanické čištění

Surová odpadní voda musí být nejprve podrobena mechanickým procesům, během kterých jsou z vody odstraněny mechanické nečistoty, jejichž výskyt v odpadní vodě je nežádoucí při dalších procesech čištění, zejména z důvodu možnosti porušení strojního zařízení ČOV.

Hrubé předčištění je krok, při kterém dochází k odstranění velkých plovoucích nebo vodou unášených nečistot. Za tímto účelem se používají lapáky šterku a česle.

Lapáky šterku jsou průtočné jímky, které jsou situované hned na přítoku do ČOV. Dochází v nich k usazování části mechanických nečistot prostou gravitací. Potom se zavřou stavidla, čímž se zastaví průtok a šterk je z lapáku mechanicky odstraněn. Největší význam mají zejména v období přívalových dešťů nebo tání sněhu, kdy je do kanalizace strháváno velké množství nečistot z městských ulic, zejména kamení a šterku.



**Obr. č. 2:** Lapák štěrku [40]

Odpadní voda opouštějící lapáky štěrku pokračuje do česlí. Česle jsou zařízení, ve kterém dochází k oddělení plovoucích předmětů a hrubších nerozpuštěných částic (zbytky ovoce a zeleniny, odpadky, trsy trávy, listí, nerozpadlé fekálie, atd.). Toto zařízení je tvořeno průtočným žlabem osazeným pevným rámem, v němž jsou v řadě vedle sebe upevněny ocelové pruty (česlice), které mechanicky zabraňují průchodu zadržovaných nečistot. Podle vzdálenosti mezi česlicemi (velikosti průlin) dělíme česle na hrubé (průliny větší než 60 mm) a jemné (průliny menší než 40 mm). Zachycené nečistoty jsou následně shrabovány z česlic pomocí hrabel a nazývají se shrabky. Tyto shrabky představují značně hygienicky závadný materiál, a proto s ním musí být podle toho nakládáno. Shrabky jsou nejčastěji likvidovány spalováním při teplotách 680 – 750 °C, kompostováním nebo skládkováním po hygienickém ošetření vápnem.



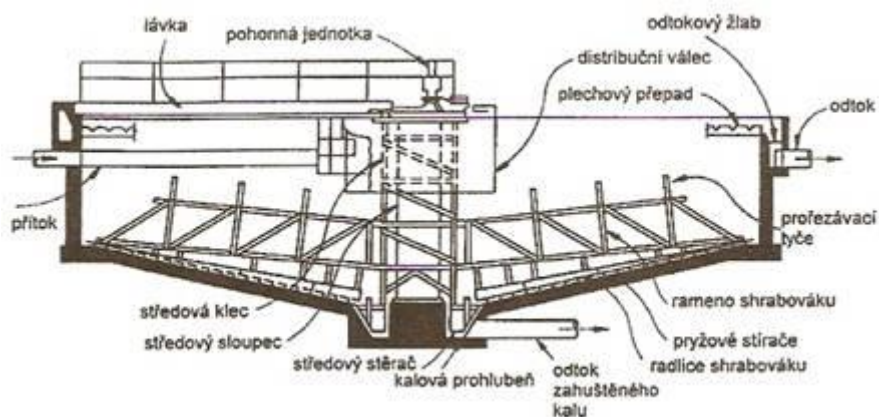
**Obr. č. 3:** Hrubé česle [39]

Následujícím krokem je mechanické čištění, během kterého je pokračováno v odstraňování tuhých částic. Patří sem lapáky písku, usazovací nádrže a zahušťovací nádrže.

Lapáky písku slouží k odstraňování drobnějšího anorganického materiálu. Používají se rozličné typy lapáků písku, jejichž konstrukce může být opravdu velmi různorodá a popis

a vysvětlení funkce všech jejich typů je nad rámec této bakalářské práce. Vždy se jedná o rozměrnou nádrž s přítokem a odtokem vody, ve které dochází k sedimentaci prostou gravitací. Písek se shromažďuje v odděleném prostoru, odkud je těžen nejčastěji mamutkou. Oproti lapákům šterku jsou lapáky písku konstruovány tak, aby byla průtočná rychlost vody při průtoku lapákem konstantní, nezávisle na aktuálním průtoku. Tím je zajištěna sedimentace částic jen o určité velikosti. Nemá-li lapák písku toto konstrukční opatření, dochází při kolísání průtoku k sedimentaci organických látek, a proto musí být přítomna pračka písku. Lapák písku může být navíc vybaven mechanismem pro separaci tuku, který vlivem nižší hustoty plave na hladině vody.

Posledním zařízením mechanického čištění jsou usazovací a zahušťovací nádrže. V usazovacích nádržích jsou odstraněny nejmenší zbytky tuhých částic, které jsou ještě schopny sedimentace. Chování suspenze i průběh sedimentace závisí na podílu tuhých částic obsažených v suspenzi. Při objemovém podílu tuhých částic v suspenzi do 0,5 % se jedná o *prosté usazování*, v rámci kterého částice sedimentují samostatně a nepůsobí na sebe navzájem. Při podílu nad 0,5 % již částice působí na sebe navzájem a rychlost sedimentace se snižuje; v tomto případě hovoříme o *rušeném usazování*. Vzroste-li koncentrace suspenze na hodnotu, kdy dojde k vytvoření fázového rozhraní voda-suspenze, hovoříme o *zahušťování suspenzí*. V tomto případě částice sedimentují jako celek. Rychlost sedimentace závisí na vlastnostech částic, jako je tvar, rozměry, hustota, atd. Na základě těchto vlastností jsou konstruovány průtočné usazovací nádrže potřebných rozměrů. Nádrže mohou mít různou konstrukci; obvykle bývají pravoúhlé nebo kruhové s horizontálním průtokem, případně kruhové s vertikálním průtokem. Na dně nádrže se hromadí surový kal, který je vypouštěn do kalové jámy a potom je bezpečně zpracováván v rámci platných podmínek kalového hospodářství v této ČOV. Vyčištěná voda odtéká odtokovým žlabem umístěným v horní části nádrže a pokračuje do nádrže, kde probíhá biologické čištění [3].



**Obr. č. 4:** Schéma (průřez) nejčastěji používaného typu usazovací nádrže [8]

#### 2.4.2 Biologické čištění

Cílem biologického čištění je odstranění organického znečištění degradací rozpuštěných anorganických a organických látek na co nejméně škodlivé produkty. Podstatou biologického čištění jsou oxidačně-redukční procesy probíhající pomocí živých organismů, které jsou obsaženy v tzv. *aktivovaném kalu*; proces čištění využívající tento kal se nazývá *aktivace* [3].

#### 2.4.2.1 Aktivovaný kal a jeho vlastnosti

Aktivovaný kal je směsná kultura, která byla poprvé vypěstována v Manchesteru v roce 1913 provzdušňováním splaškových vod. Má podobu suspenze, která je tvořená organickými a anorganickými zbytky z odpadní vody a mikroorganismy. Obsah sušiny se pohybuje v rozmezí 2 – 10 g/l. Přítomné organismy se tam nacházejí proto, že odpadní voda je pro ně bohatým zdrojem potravy. Kromě toho výrazně urychlují a zlepšují dekompoziční procesy nutné pro čištění vod. Dochází tu především k rozkladu uhlíkatých skeletů organických látek za aerobních podmínek na  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  a dále také k využití odpadních látek pro anabolické účely v tělech organismů. Mezi významné nutrienty patří zejména dusík a fosfor. Znamená to, že tu probíhá nitrifikace, tj. oxidace amoniakálního dusíku na  $\text{NO}_3^-$  přes  $\text{NO}_2^-$  a rovněž denitrifikace, což je proces redukce  $\text{NO}_3^-$  na  $\text{N}_2$ . Fosfor je využit zejména pro syntézu polyfosfátů, především adenosintrifosfátu (ATP). Aktivovaný kal průběžně vzniká během biologického čištění, v rámci kterého je do dosazovacích nádrží, obsahujících odpadní vodu, přidáván zahuštěný kal. Po čištění je kal opět odebrán a zpracován v kalovém hospodářství, aby jeho část mohla být opět využita při dalším čištění. Nejčastěji obsahuje bakterie z rodů *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* jiné. Dále jsou zde přítomny nitrifikační bakterie z rodů *Nitrosomonas* a *Nitrobacter*. Kromě bakterií obsahuje aktivovaný kal také vyšší organismy, např. některé druhy protozoí, vířníků, hlístic a také prvoky. Přesné složení kultury závisí na složení odpadních vod a na technologickém postupu kultivace.

Důležitou vlastností aktivovaného kalu je schopnost flokulace – tvorba vloček. Tyto vločky lze od kapalné fáze oddělit prostou sedimentací, což je velmi výhodné z hlediska technologické náročnosti [3].

#### 2.4.2.2 Průběh biologického čištění

Mechanicky vyčištěná odpadní voda je čerpána do *aktivační nádrže*, kde je do ní přimícháván recirkulovaný aktivovaný kal. Aktivační nádrž má protáhlý obdélníkový půdorys s přítokem a odtokem na protilehlých kratších stranách. Dmychadlem je do těchto nádrží vháněn vzduch, aby měly mikroorganismy dostatečný přísun kyslíku pro oxidační procesy; jedná se proto o *aerobní* proces. Potom míří směs do *dosazovací nádrže*, kde je aktivovaný kal oddělen od vyčištěné vody. Dosazovací nádrž má podobnou konstrukci jako usazovací nádrž využitá při mechanickém čištění; znamená to, že má kruhový tvar a kal v ní sedimentuje na dně, odkud je průběžně mechanicky shrabován a recirkulován zpět do aktivační nádrže. Vyčištěná voda je z dosazovací nádrže kontinuálně vypouštěna do recipientu.

Protože mikroorganismy přítomné v aktivovaném kalu přijímají po celou dobu procesu potravu, je průběh biologického čištění doprovázen nárůstem množství biomasy aktivovaného kalu. Přebytný kal je z procesu průběžně odstraňován, protože je ho zapotřebí jen určité množství [3].

#### 2.4.3 Zpracování čistírenských kalů

Smísením primárního kalu z usazovací nádrže (z mechanického čištění) a přebytečného aktivovaného kalu z dosazovací nádrže (z biologického čištění) je získán surový kal, který je nutno dále zpracovat na bezpečné produkty. Surový kal putuje do vyhnívací nádrže, kde

dochází k methanizaci (anaerobní fermentaci), jejímž produktem je bioplyn (směs  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ , a dalších plynů). Vyhnilý kal představuje směs biologicky nerozložitelných organických a anorganických látek, je bez zápachu a hygienicky nezávadný, a to na rozdíl od surového kalu [3].

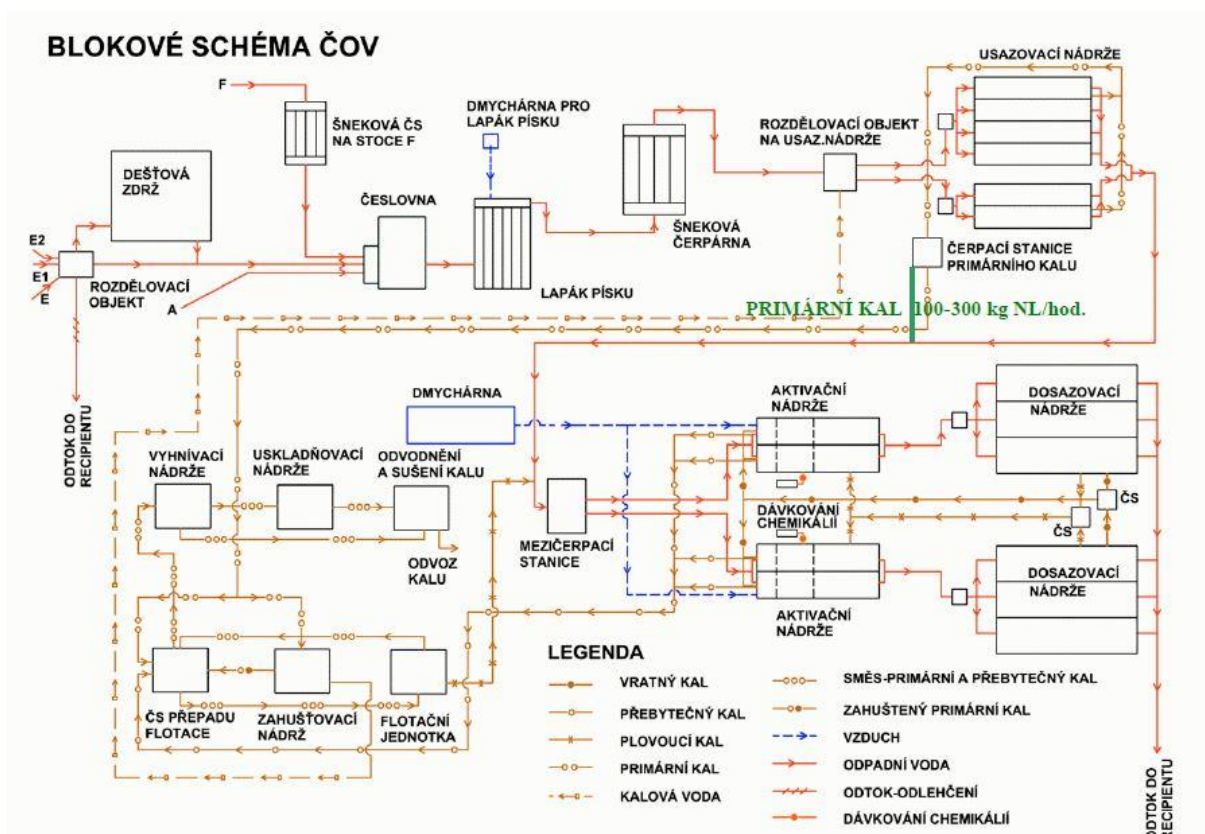
#### **2.4.4 ČOV Brno - Modřice**

Čistírna odpadních vod v Brně - Modřicích je provozována společností Brněnské vodárny a kanalizace, a.s. a zajišťuje čištění odpadních vod z města Brna a jeho okolí. Kromě Brna jsou na tuto čistírnu napojena města Modřice a Kuřim, dále obce Želešice, Česká u Brna, Šlapanice, Bedřichovice, Ostopovice, Moravské Knínice, Lipůvka, Podolí, Ponětovice a Rozdrojovice; celkem je na ČOV napojeno přibližně 490 000 ekvivalentních obyvatel (EO). Přibližnou rozlohu oblasti v současnosti kanalizačně napojené na ČOV v Brně - Modřicích znázorňuje Obr. č. 6.

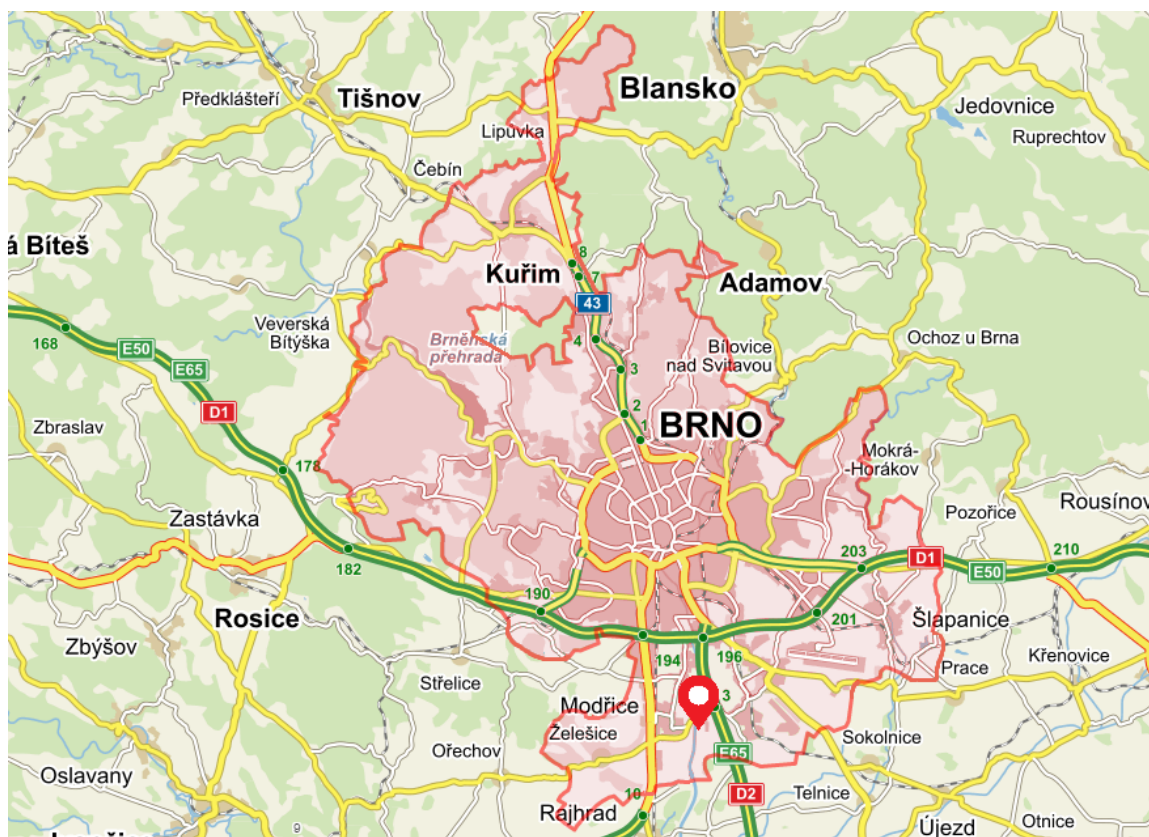
Čistírna je koncipována jako klasická dvoustupňová čistírna s mechanickým a biologickým stupněm čištění, která jedoplněná chemickým dočištěním. ČOV obsahuje předřazenou dešťovou zdrž o kapacitě  $10\,500\text{ m}^3$ , aby nedošlo k přetížení ČOV v případě přívalových dešťů. Technologická linka ČOV zahrnuje lapák štěrku, kde je voda zbavena hrubého štěrku, potom stojně stírané česle s šířkou průlin 6 mm a lapák písku vybavený zařízením na separaci tuku. Odtud je voda čerpána do šesti usazovacích nádrží, ve kterých dochází k sedimentaci a také k oddělení primárního kalu; obvykle jsou využívány pouze čtyři, zbylé dvě jsou využívány převážně v případě dešťů.

Po mechanickém čištění putuje voda nejprve do nádrží, kde probíhá anaerobní defosfatace; odtud postupuje do oběhové anoxické nádrže, kde probíhá denitrifikace. Následně pokračuje aktivace v oxické aktivací nádrži s jemnobublinnou aerací, odkud voda míří do dosazovacích nádrží a potom do recipientu, kterým je v tomto případě řeka Svratka. Část vyčištěné vody je čerpána do chlorovny, kde je voda upravena na vodu užitkovou. Schéma technologické linky ČOV v Brně - Modřicích znázorňuje Obr. č. 5 [6].





Obr. č. 5: Blokované schéma ČOV v Brně – Modřicích [6]



Obr. č. 6: Přibližná rozloha oblasti spadající pod ČOV v Brně - Modřicích (růžově) s vyznačením polohy ČOV (červená značka)



**Obr. č. 7:** Letecký pohled na ČOV v Brně - Modřicích; v levé části obrázku lze spatřit kruhové usazovací nádrže, vpravo pak aktivační a kruhové dosazovací nádrže a v dolní části obrázku rovněž řeku Svratku [6]

#### 2.4.5 ČOV A

Podobně jako v případě ČOV v Brně-Modřicích se jedná o dvoustupňovou čistírnu s mechanickým a biologickým stupněm čištění. Na tuto ČOV je napojeno 18 000 EO. ČOV je na hranici látkového zatížení, má malý objem aktivační nádrže a uplatňuje se zde kratší kontakt s kalem.

#### 2.4.6 ČOV B

Rovněž se jedná o dvoustupňovou čistírnu. V současné době tato ČOV čistí vodu od 19 000 EO, není hydraulicky ani látkově zatížena a kontakt s aktivovaným kalem je delší.

#### 2.4.7 Možnosti eliminace benzodiazepinů z odpadních vod

Při eliminaci organických látek z odpadních vod, mezi které patří i léčiva, se uplatňují jednak sorpční mechanismy – zejména sorpce na primární nebo aktivovaný kal, a dále také degradační procesy, které probíhají částečně ve fázi biologického čištění za pomoci aktivovaného kalu; k tomuto účelu může být do technologické linky rovněž vřazeno chemické dočištění [3].

##### 2.4.7.1 Sorpce na kal

Při biologickém čištění nedochází k biologickému rozkladu benzodiazepinových derivátů v efektivní míře. Dochází však k sorpci těchto lipofilních léčiv na kal pomocí hydrofobních

interakcí, neboť kal obsahuje lipofilní fragmenty. Při anaerobním vyhnívání kalu dosahuje míra degradace benzodiazepinů obsažených v kalu až 50 %. Odpadní voda rovněž obsahuje určité množství tuků, přičemž tato léčiva přecházejí z velké části do této nevodné fáze, která je odstraněna lapačem tuků [35].

#### **2.4.7.2 Chemická oxidace a fotodegradace**

Organické polutanty v odpadní vodě reagují se silnými oxidačními činidly radikálovým mechanismem, přičemž se využívají radikály  $\cdot\text{OH}$  (přídavek  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nebo kyslíkový radikál (zdroj  $\text{O}_3$ ). Chemická oxidace bývá zařazena až za stupeň biologického čištění, neboť přítomnost oxidačních činidel v aktivační nádrži by způsobila destrukci živých organismů přítomných v aktivovaném kalu.

Fotodegradace je důsledek absorpce světelného záření molekulou. Aby došlo k destrukci molekuly, musí absorbované množství energie převyšovat vazebnou energii atomů v molekule. Účinnost fotolýzy může být značně snížena zákalem vody nebo nedostatkem slunečního svitu. Benzodiazepiny jsou však poměrně fotostabilní a při pokusu o jejich odstranění z odpadních vod pomocí UV záření byly degradovány přibližně z 10 %.

Velmi účinnou metodou pro odstranění farmak, včetně benzodiazepinů z odpadních vod, je fotodegradace UV zářením, která může být podpořena přidavkem malého množství  $\text{H}_2\text{O}_2$  nebo dvojmocného železa.  $\text{Fe}^{2+}$  tvoří s molekulami farmak organokovové komplexy s vysokým molárním absorpčním koeficientem; potom dochází k intenzivnější absorpci záření a k výraznému zefektivnění fotodegradace [35], [36].

#### **2.4.7.3 Sorpce na aktivní uhlí**

Hydrofobní léčiva se rovněž velmi dobře sorbují na aktivní uhlí. Bylo prokázáno, že účinnost odstranění diazepamu z odpadních vod tímto způsobem dosahuje více než 99 % při přidavku 2 g práškového aktivního uhlí do 1 litru odpadní vody [35].

### **2.5 Postup analýzy léčiv obsažených v odpadních vodách**

Standardní operační postup (SOP) stanovení obsahu léčiv v odpadních vodách zahrnuje vzorkování odpadních vod, prekoncentraci a následně kvantitativní analýzu.

#### **2.5.1 Vzorkování odpadních vod**

Správnému odběru vzorku je nutno věnovat zvýšenou pozornost, neboť špatně provedený odběr má za následek kompletní znehodnocení výsledků měření a takový vzorek potom nemá žádnou vypovídací hodnotu. Správný postup odběru vzorků odpadních vod je uveden v příslušné státní normě (ČSN ISO 5667-10 Jakost vod. Odběr vzorků. Část 10: Pokyny pro odběr vzorků odpadních vod) [7].

Při odběru vzorků z odpadních vod z kanalizační sítě nebo z čistíren odpadních vod se nejčastěji odebírají vzorky prosté bodové nebo směsné režimové.

Prostý bodový vzorek se odebírá jednorázově, většinou manuálně pomocí vhodné nádoby (nejlépe tmavé skleněné lahve), lze však použít i speciální odběrové nádoby.



Směsný režimový vzorek sestává z několika dílčích vzorků. Odběrem několika průtokově závislých dílčích vzorků v pravidelných časových intervalech a jejich následným smísením je získán směsný vzorek, který reprezentuje průměrné složení odpadní vody. K odběru těchto typů vzorků slouží automatické vzorkovače, které jsou zobrazeny na Obr. č. 8 [7].



**Obr. č. 8:** *Různé typy automatických vzorkovačů pro režimový odběr odpadních vod [47]*

### 2.5.2 Extrakce tuhou fází (SPE)

Tato metoda slouží k zkoncentrování vybraných analytů obsažených v kapalném vzorku v případě, pokud jsou koncentrace tak nízké, že by nebylo možno analyty stanovit běžnými analytickými postupy. Protože ve vzorcích odpadních vod očekáváme velmi nízké koncentrace sledovaných léčiv, obvykle v řádu  $\text{ng.l}^{-1}$ , je nutné analyzovaný vzorek nejprve zkoncentrovat. Zkoncentrováním dojde ke snížení meze stanovitelnosti a takto upravený vzorek již může být analyzován vhodnou separační metodou. Kromě zkoncentrování analytu lze SPE použít rovněž k odstranění balastních látek ze zkoumaného vzorku.

Při použití této metody jsou nejdůležitější součástí polyethylenové kolonky plněné sorbentem. Kolonky mají tvar injekční stříkačky a komerčně jsou dostupné v různých velikostech (objemy cca 0,5 – 6 ml) [48].

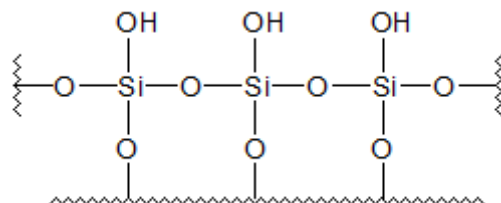


**Obr. č. 9:** *SPE kolonky různých objemů [41]*

### 2.5.2.1 Druhy separace podle typu sorbentu

- *Normální fáze*

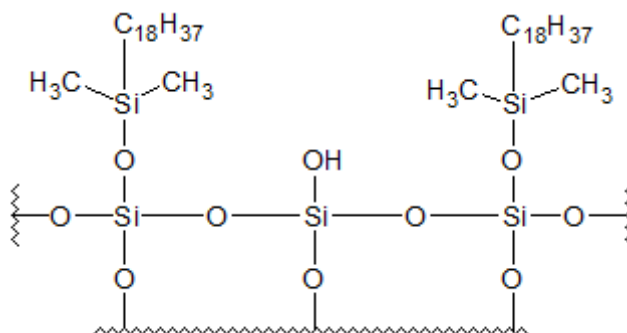
Sorbentem je polární polymer – silikagel, alumina, apod. Nejčastěji se tato fáze využívá k oddělení polárních organických látek z roztoku. Polární silanolové skupiny Si–OH přitahují polární funkční skupiny analytů [48].



**Obr. č. 10:** Chemická struktura silikagelu

- *Reverzní fáze*

Sorbentem je v tomto případě nejčastěji modifikovaný silikagel – oktadecylsilikagel, fenylsilikagel, apod. To znamená, že určité procento povrchových –OH skupin v silikagelu je nahrazeno nepolárním uhlíkatým zbytkem, nejčastěji oktylem, oktadecylem, fenylem, nebo jejich kombinací. Tento sorbent umožňuje oddělení nepolárních organických látek a v environmentální analýze se využívá nejčastěji. Pomocí těchto sorbentů lze oddělit řadu kontaminantů z vodných vzorků, například léčiva, PAHs, apod. [48].



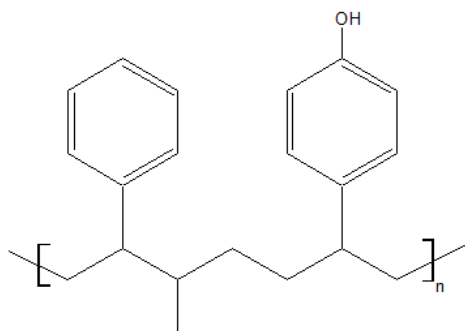
**Obr. č. 11:** Chemická struktura oktadecylsilikagelu

- *Iontově výměnná fáze*

Povrch sorbentu obsahuje iontoměnič. Jako měnič aniontů se používá např. kvartérní amin  $\text{NR}_4^+$ , jako měnič kationtů karboxylová kyselina  $\text{COO}^-$  nebo sulfonová kyselina  $\text{SO}_3^-$ . Takto lze oddělit z roztoku látky nabitě, které jsou zachyceny na sorbentu v kolonce [48].

- *Polymerní fáze*

Tento typ sorbentu je tvořen syntetickými polymery. Používá se např. polystyren, který zachycuje hydrofobní látky, nebo hydrofilně modifikovaný polystyren (viz Obr. č. 12), který dokáže zachycovat látky v širokém hydrofilně-lipofilním rozsahu a rovněž v širokém spektru pH matrice; při analýze léčiv se hojně využívá [37].

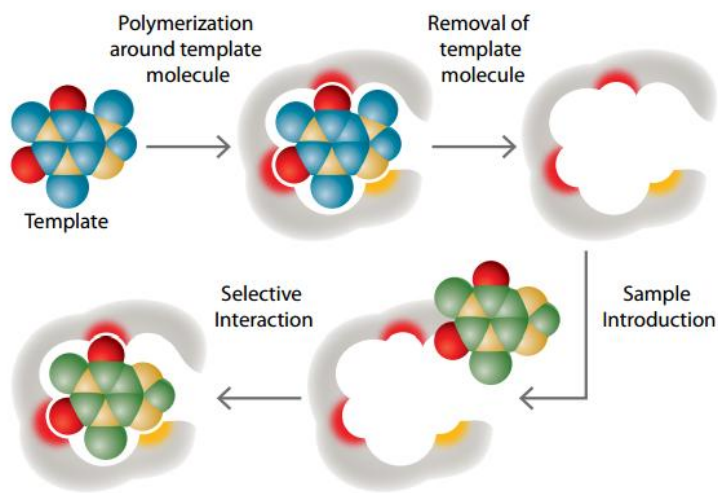


**Obr. č. 12:** Struktura hydrofilně modifikovaného polystyrenu [37]

- *Fáze na bázi molekulárně vtištěných polymerů*

Molekulárně vtištěné polymery (MIPs – Molecularly Imprinted Polymers) jsou skupinou hojně zesíťovaných polymerních fází, která obsahují místa stéricky a chemicky komplementární pouze k jedné molekule nebo k úzké skupině podobných molekul. Vytváří se zpolymerováním adsorbentu v přítomnosti jiné látky, jejíž molekuly jsou chemicky podobné molekulám, které mají být na MIPs zachycovány. Tím se ve struktuře polymeru vytvoří specifická vazebná místa.

Výsledkem SPE provedené pomocí MIPs je velmi čistý extrakt s minimálním obsahem nežádoucích interferencí. Dochází tedy ke značnému snížení limitů detekce [42].



**Obr. č. 13:** Princip přípravy a funkce MIPs [42]

### 2.5.2.2 Popis aparatury

Aparatura sestává ze skleněné nádoby, která má na víku umístěné ventily. Do těchto ventilů se umístí potřebný počet kolonek a zbylé ventily se uzavřou. Ve spodní části nádoby se nachází přípojka pro vývěvu. Aparatura musí být dokonale utěsněná. Dovnitř nádoby lze vložit stojan na zkumavky, do kterých jsou jímány eluáty z jednotlivých kolonek [48].



*Obr. č. 14: Aparatura pro SPE [11]*

### **2.5.2.3 Postup extrakce**

- *Kondicionace*

Kondicionací kolonky se rozumí aktivace sorbentu pomocí vhodného rozpouštědla. Provádí se tak, že rozpouštědlo se jednoduše nadávkuje do kolonek a nechá se kolonkou pomocí vakua protéci. Způsobí, že funkční skupiny na povrchu sorbentu zaujmou takovou polohu, aby měly maximální schopnost retence analytů (jsou „zplihlé“, během kondicionace se „naježí“, čímž se zvětší jejich užitná plocha). Typ kondicionačního rozpouštědla závisí na typu sorbentu a na matrici vzorku, zejména na jejich polaritě, náboji a vzájemné mísitelnosti. V instruktážním letáku ke kolonkám je vždy uvedeno obecně použitelné rozpouštědlo, avšak není nezbytné podle tohoto letáku postupovat, záleží vždy na podmínkách prováděné analýzy. Kromě toho je možné provést ještě druhý kondicionační krok pomocí rozpouštědla, které má podobné vlastnosti jako matrice vzorku [48].

- *Dávkování vzorku*

Obvykle je dávkováno 200 ml kapalného vzorku na jednu kolonku, záleží však vždy na její kapacitě. Takto se na sorbentu v kolonce zachytí nejen sledované analyty, ale také balastní látky. Matrice se potom oddělí.

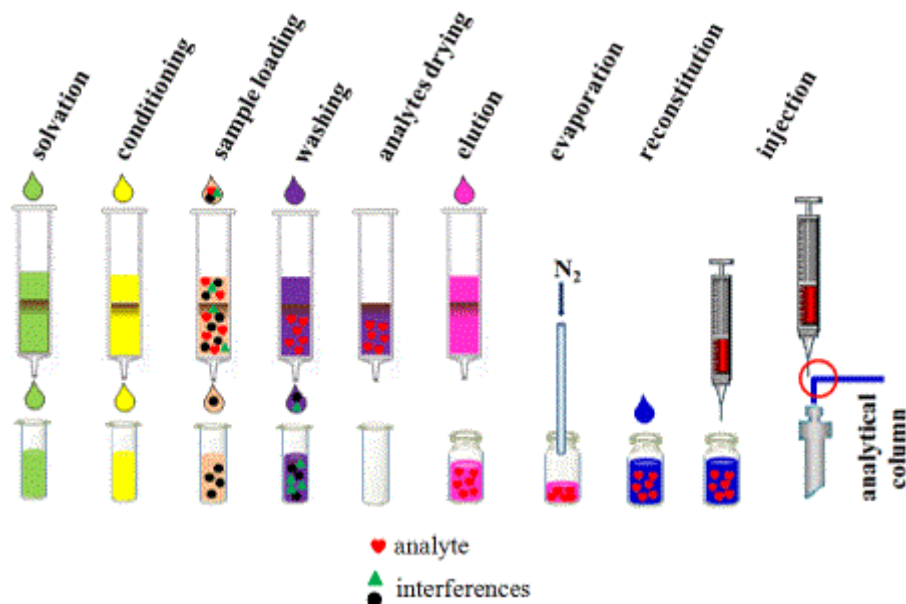
- *Vymytí balastních látek*

Pro odstranění balastních látek je nutné vybrat takové rozpouštědlo, v němž jsou přítomné balastní látky dobře rozpustné a sledované analyty naopak nerozpustné, což je ideální případ. Analyty zůstanou na kolonce, kdežto balastní látky jsou eliminovány. V praxi je však zapotřebí zvolit určitý kompromis a použít směsi rozpouštědel.

- *Eluce analytu*

Eluce analytu je prováděna vhodným rozpouštědlem, které je schopno uvolnit analyt ze sorbentu. Eluát je jímán do zkumavek, rozpouštědla je zbaven pod proudem dusíku

a rozpouštědlem doplněn na určitý, předem definovaný objem. Takto připravený vzorek již může být analyzován, nejlépe pomocí separačních metod (HPLC, GC) [48].



Obr. č. 15: Obecný postup SPE [10]

### 2.5.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Na základě studia vědeckých publikací byla pro stanovení obsahu sledovaných léčiv v odpadních vodách zvolena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Pro správnou volbu typu detekce byly porovnány metody detekce pomocí detektoru s diodovým polem (DAD) a detektorem hmotnostně spektrometrickým (MS).

#### 2.5.3.1 Princip chromatografie

Analyzovaný vzorek v kapalném stavu je aplikován do soustavy dvou vzájemně nemísitelných fází, z nichž jedna je stacionární (nepohyblivá) a druhá mobilní (pohyblivá). V případě HPLC je stacionární fáze umístěna v nerezové koloně ve formě pevných částic jednotné velikosti, mezi kterými protéká mobilní fáze, čímž je zajištěna co největší plocha mezifázového rozhraní, na kterém může probíhat přestup analytů mezi fázemi. Vzorek je aplikován na počátek kolony, přičemž dochází k jeho rozdělení mezi obě fáze na základě distribuční konstanty  $K_D$ .

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} \quad (1)$$

kde  $c_s$  a  $c_m$  jsou rovnovážné koncentrace dané látky ve stacionární a mobilní fázi. Distribuční konstanta závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech stacionární fáze, mobilní fáze a sledovaných analytů (polarita, míra lipofility, schopnost adsorpce). Při pohybu mobilní fáze dochází k pohybu analytů kolonou a v důsledku opakovaného utváření rovnovážných stavů dochází k rozdělení jednotlivých analytů, protože různé látky mají rozdílnou hodnotu

distribučních konstant v daném systému fází. Pokud se od sebe neliší dostatečně hodnoty  $K_D$  dvou složek vzorku, nelze tyto složky v daném systému od sebe oddělit.

Za stejných podmínek je čas průchodu kolonou charakteristický pro každou látku a nazývá se retenční čas  $R_t$ , který je využíván pro identifikaci, tj. pro kvalitativní charakteristiku. Čím je hodnota  $K_D$  látky vyšší, tím má tato látka vyšší afinitu ke stacionární fázi. Proto je na koloně více zadržována a její retenční čas bude vyšší.

Pro kvantifikaci je využíván výpočet plochy píku generovaného počítačem, a to na základě odezvy detektoru, umístěného na konci kolony při průchodu analyzovaných látek systémem.

Jako stacionární fáze se v HPLC využívá čistý nebo modifikovaný silikagel, popř. jiné polymerní látky. Mobilní fáze je kapalná a podle povahy zjišťovaných analytů lze použít deionizovanou vodu ve stavu čistém, případně s obsahem pufru, kyselin nebo zásad, ale je možné použít i organická rozpouštědla (acetonitril, methanol aj.) nebo jejich směsi [5], [25].

Pro stanovení neutrálních lipofilních léčiv, kterými jsou rovněž benzodiazepiny, se nejčastěji používají kolony plněné oktadecylsilikagelem a jako mobilní fáze se volí obvykle voda s obsahem pufru nebo kyseliny v kombinaci s acetonitrilem.

#### 2.5.3.2 Instrumentace HPLC

Zařízení pro kapalinovou chromatografii, znázorněné na Obr. č. 16, je složeno z těchto základních součástí: zásobní lahve s rozpouštědly pro tvorbu mobilní fáze, odplyňovač mobilní fáze, čerpadlo mobilní fáze, dávkovač vzorku, kolona naplněná stacionární fází, detektor a vyhodnocovací zařízení (ChemStation). Schéma součástí kapalinového chromatografu je znázorněno na Obr. č. 17.



**Obr. č. 16:** Kapalinový chromatograf, typ Agilent 1100 [46]

Zásobní lahve jsou vesměs vyrobeny z borosilikátového skla, mohou být až čtyři, a to z důvodu možnosti aplikovat gradientovou eluci; jejich objem bývá většinou 1 litr. Mobilní fáze je přes odplyňovač mobilní fáze vedena hadičkou do čerpadla.

Odplyňovač mobilní fáze zahrnuje polopropustnou trubici uzavřenou ve vakuové komoře. V důsledku sníženého tlaku v komoře přecházejí rozpuštěné plyny z mobilní fáze přes polopropustnou stěnu hadičky pryč. Starší systémy obsahovaly místo tohoto způsobu probublávání inertním plynem (např. He). Odplyňovač je nutný z toho důvodu, že mobilní fáze je na kolonu dávkována pod vysokým tlakem (desítky MPa); na koloně dochází k dekompresi a rozpuštěné plyny se uvolňují jako bublinky, což způsobuje problémy při detekci.

Čerpadlo musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze a mít možnost izokratické (složení mobilní fáze se nemění) i gradientové eluce (složení mobilní fáze se mění během analýzy). V případě izokratické eluce musí čerpadlo zajišťovat stálý tlak na vstupu do kolony, v případě eluce gradientové toto není možno zajistit v důsledku různých hodnot objemové stlačitelnosti jednotlivých složek mobilní fáze (při zachování objemového toku); rozhodně však nesmí docházet k nahodilé fluktuaci tlaku; změna tlaku je úměrná změně složení mobilní fáze v čase. Objemový tok mobilní fáze musí být konstantní, bezpulzní. Dnes se téměř výhradně využívá čerpadlo se dvěma písty v sériovém uspořádání.

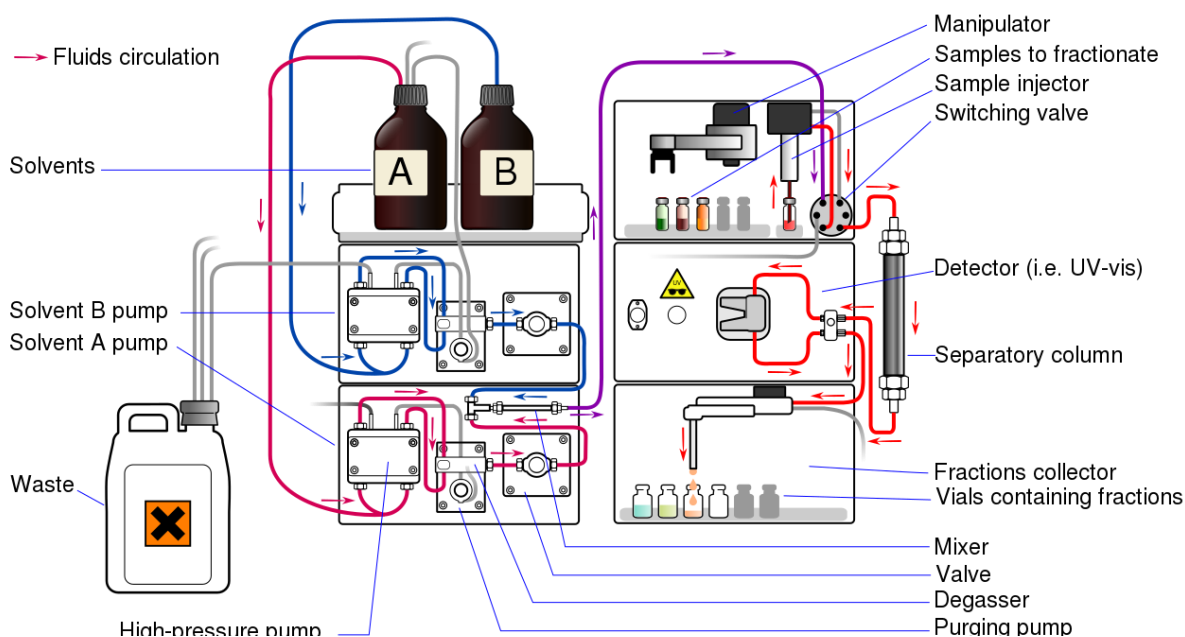
Dávkování vzorku je vzhledem k vysokému tlaku na vstupu do kolony realizováno dávkovací smyčkou. Ta je zpravidla realizována jako součást automatického dávkovače. Dutou jehlou dávkovače je propíchnuto septum vialky se vzorkem a na kolonu je dávkován volitelný objem vzorku.

Kolony se používají většinou náplňové, zřídka monolitické, a mají podobu dutých nerezových trubic různých rozměrů. Náplň jedné kolony je tvořena částicemi stejného typu a rozměrů, částice mohou být porézní nebo mohou mít inertní jádro pokryté aktivním sorbentem, což zvyšuje účinnost separace. Roli sorbentu v HPLC nejčastěji plní silikagel (neupravený nebo modifikovaný), alumina, aktivní uhlí nebo jiné syntetické polymery. Velikost částic se pohybuje v závislosti na typu kolony a účelu použití v rozmezí jednotek až desítek  $\mu\text{m}$ . Prostor mezi částicemi, kudy proudí mobilní fáze, je značně omezený a klade průtoku mobilní fáze velký odpor, a proto je nutné použití vysokotlakého čerpadla.

Eluát z kolony míří do průtokové cely detektoru. Podstatou všech typů detektorů je kontinuální měření určité fyzikální veličiny v čase. Hodnoty měřené veličiny jsou závislé na složení eluované směsi a jsou průběžně převáděny na elektrický signál a jejich průběh je zobrazován v počítači. Při změně složení eluátu v průtokové cele (tj. v přítomnosti analytů) dochází ke změnám hodnot měřených fyzikálních veličin a také ke změně tvaru zobrazované křivky odpovídající této závislosti. Je-li soustava správně optimalizovaná pro měření sledovaných analytů, křivka má v čase průchodu sledovaného analytu detektorem tvar symetrického Gaussovského píku [5], [25].

Pro analýzu léčiv lze využít UV detektor (benzenová jádra absorbují UV) a pro zlepšení možnosti vyhodnocení je vhodný detektor s diodovým polem. Pro stopové analýzy je vhodný hmotnostně spektrometrický detektor.





**Obr. č. 17:** Schéma uspořádání zařízení pro HPLC. Zařízení pro jímání eluovaných frakcí (na obrázku vpravo dole) nemusí být zařazeno, pokud nemá být s jednotlivými frakcemi dále nakládáno [45]

### 2.5.3.3 Detektor s diodovým polem (DAD)

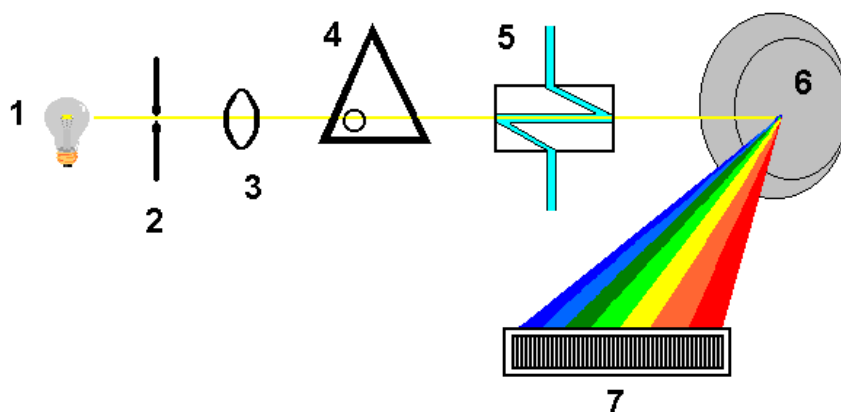
Detektor s diodovým polem (DAD; DiodeArrayDetector) patří mezi spektrofotometrické detektory a je založen na měření absorbance vzorku při několika vlnových délkách současně, a to pomocí několika diod v rozmezí 190 až 800 nm. Schéma detektoru je na Obr. č. 18. Kvantifikaci i v tomto případě umožňuje vztah mezi absorbancí a Lambert-Beerovým zákonem:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

$A$  je absorbance,  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient [ $\text{l/mol/cm}$ ],  $c$  je koncentrace měřené složky ve vzorku [ $\text{mol/l}$ ] a  $l$  je tloušťka měrné cely nebo kyvety [ $\text{cm}$ ]. Molární absorpční koeficient  $\varepsilon$  je charakteristický pro každou látku při určité vlnové délce, tloušťka měrné cely  $l$  je konstantní; proto lze kvantifikaci založit na změření závislosti  $A = f(c)$ . Koncentrační rozsah kalibrace a měření vzorku volíme tak, aby daná závislost v tomto rozsahu byla lineární.

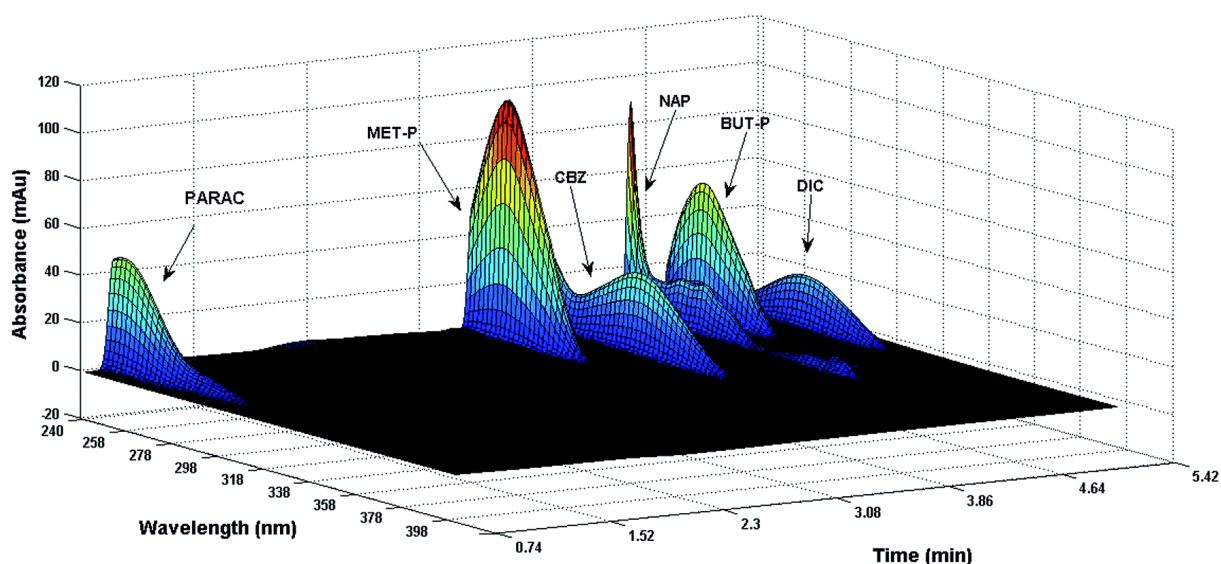
Záření ze zdroje prochází štěrbinou, čočkou, clonou a potom průtokovou celou detektoru, kde dochází k absorpci. Po dopadu na holografickou mřížku za měrnou celou dochází ke spektrálnímu rozložení záření a na každou z fotodiod dopadá zářivý tok o určité vlnové délce, což způsobí vznik fotoelektrického proudu, který vybije kondenzátor připojený k diodě a měří se velikost proudu, který je nutný pro opětovné dobíjení kondenzátoru [25].





**Obr. č. 18:** Schéma detektoru s diodovým polem. 1 – zdroj záření, 2 – štěrba, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – měrná cela, 6 – holografická mřížka, 7 – řada diod [25]

Mezi hlavní výhody DAD detekce je možnost kontinuálního měření celých spekter, možnost jejich porovnání s uživatelskou knihovnou a na základě toho potom identifikovat a stanovit neznámé látky ve vzorku.



**Obr. č. 19:** Typický výstup detektoru s diodovým polem při kontinuálním snímání spekter [29]

V této práci byl DAD detektor využit k určení absorpčních maxim stanovovaných léčiv pro dosažení co nejnižší meze detekce. Každé léčivo má absorpční maximum při jiné vlnové délce, a proto bylo možno snímat tyto vlnové délky najednou a poté vyhodnotit [25].

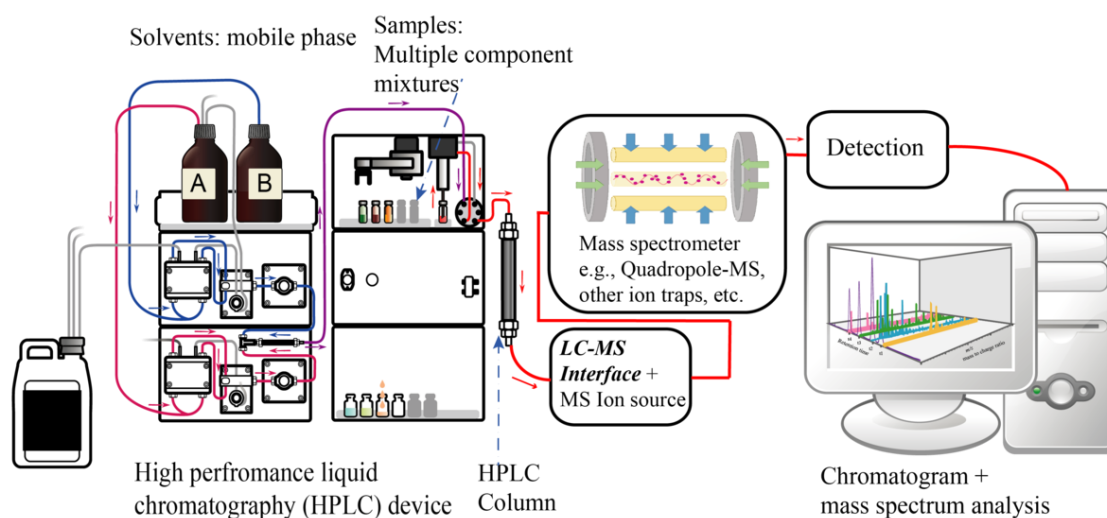
#### 2.5.3.4 HPLC a MS detektor

Jedná se o tandemové spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru (MS – MassSpectrometer, MassSpectrometry). Přístroje lze vidět na Obr. č. 20.



**Obr. č. 20:** Vlevo kapalinový chromatograf, vpravo připojený hmotnostní spektrometr [43]

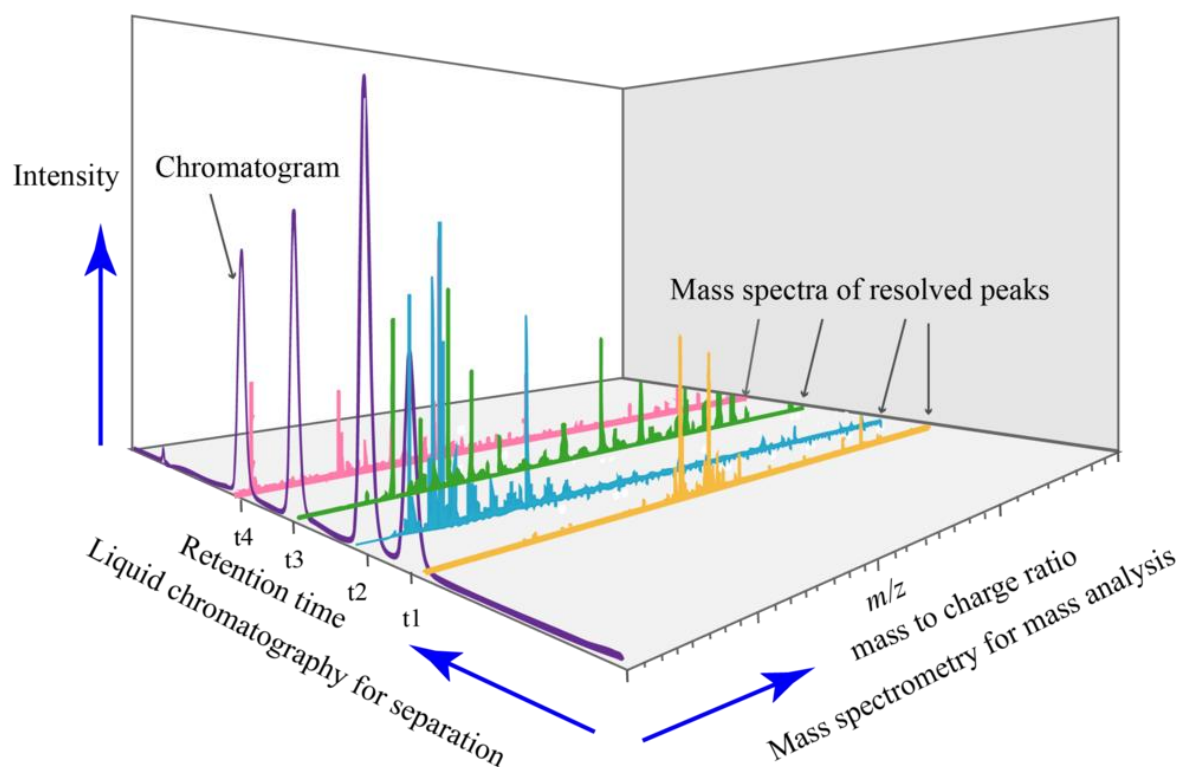
Tato technika poskytuje velmi nízké meze detekce a kvantifikace. Na koloně pro LC dojde nejprve k rozdělení analytů ve vzorku podle retenčního času na jednotlivé zóny (průběh separace obvykle sledujeme na chromatogramu pomocí UV-VIS detektoru). Eluát na výstupu z kolony pro LC míří do sprejovacího zařízení připojeného hmotnostního spektrometru, kde dochází k ionizaci molekul přítomných v eluátu. Tyto ionty jsou potom v analyzátoru separovány podle efektivní hmotnosti  $m/z$  (hmotnost/náboj) a následně pak dopadají na detektor. Tím bývá elektronový násobič, který zesiluje signál. Schéma zapojení je na Obr. č. 21.



**Obr. č. 21:** Schéma zapojení součástí kapalinoveného chromatografu s MS detektorem [44]

Ještě dochází k rozlišení látek v jednotlivých zónách na koloně na základě jejich efektivních molekulových hmotností  $m/z$  (viz Obr. č. 22). Tímto je sice snížena intenzita

signálu, ale mnohem více je snížena intenzita šumu. Šum bývá způsoben fluktuacemi teploty detektoru, nestabilitou signálu a dalšími náhodnými vlivy. Projevuje se náhodnými fluktuacemi signálu, které při nižších odezvách znemožňují identifikaci píku, pro kterou je důležitý poměr signál/šum. Ten se tandemovým zapojením LC-MS zvyšuje a v důsledku toho se zvyšují i meze detekce. Tato metoda je velmi vhodná pro analýzu stopového množství analytů ve složitých matricích, jako jsou např. léčiva v odpadních vodách [26].



**Obr. č. 22:** Typický výstup měření pomocí LC-MS [44]

## 2.6 Matriční efekt

Je to jev, kdy vlivem složitosti matrice dochází ke snížení analytického signálu při stanovení vybraného analytu [5].

Při měření koncentrací stopových složek odpadních vod je typickým důsledkem matričního efektu získání vyšších koncentrací těchto látek na odtoku než na přítoku, neboť odtok je méně složitá matrice a obsahuje méně látek způsobujících interferenci než přítok. V některých případech k tomu může dojít i z jiných důvodů, než je matriční efekt. Např. obsah metabolitů léčivých látek může být skutečně na odtoku vyšší, neboť léčiva přitékající do ČOV v původní formě mohou být zčásti transformována na metabolity živými organismy v průběhu biologického čištění, pokud zároveň tyto metabolity nejsou biologickou aktivací z vody eliminovány.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Seznam použitých přístrojů a pomůcek

- Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity (Agilent, USA)
- HPLC kolona ZORBAX EclipsePlus SB-C18, rozměry 2,1 × 100 mm, velikost částic 1,8 μm (Agilent, USA)
- Ultrazvuková vodní lázeň Teson 4 (Tesla, Česká republika)
- Centrifuga EBA 20 (Hettich, Německo)
- Rotační vakuová odparka Rotavapor (Büchi, Švýcarsko)
- SPE extraktor SPE-12G (J. T. Baker<sup>®</sup>, Nizozemsko)
- Membránová vakuová vývěva Laboport<sup>®</sup> (KNF Neuberger, Německo)
- SPE kolonky Supel<sup>™</sup>-Select HLB, 200 mg, 6 ml (Sigma-Aldrich, Německo)
- Stříkačkové filtry LUT SyringeFilters PTFE, 0,45 μm (Labicom, Česká republika)
- Stříkačkové filtry CronusSyringeFilters Nylon; 0,2 μm (SMI-LabHut, Velká Británie)
- Kvalitativní papírové filtry kruhové KA 4, průměr 150 mm (Papírna Perštejn s.r.o., Česká republika)
- Filtr ze skleněných vláken MN GF 1, průměr 55mm (Macherey-Nagel, Německo)
- Váhy analytické, HR-120-EC, (A&D Instruments, Japonsko)
- Běžné laboratorní vybavení

#### 3.2 Použitý software

- ChemStation for LC & LC/MS Systems, ver. 32.1 (Agilent, USA)
- Microsoft Office Word 2007 (Microsoft, USA)
- Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, USA)
- ChemSketch (ACD/Labs, Kanada)
- GIMP 2.8 (The GIMP Development Team)
- Malování (Microsoft, USA)

#### 3.3 Seznam použitých chemikálií a standardů

- Deionizovaná voda (vodivost 0,056 μS/cm při 24 °C) připravená přístrojem Milli-Q<sup>®</sup> Academic (Millipore, Francie)
- Kyselina trifluoroctová, CHROMASOLV<sup>®</sup> for HPLC, čistota ≥ 99,0 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Acetonitril, Gradient Grade for HPLC, čistota ≥ 99,9 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Methanol, HPLC Gradient Grade, čistota ≥ 99,8 % (J. T. Baker<sup>®</sup>, Nizozemsko)
- Diazepam, čistota ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Bromazepam, přípravek Lexaurin<sup>®</sup> 1,5 mg (Krka, ČR)
- Oxazepam, přípravek Oxazepam Léčiva 10 mg (Zentiva, ČR)
- Alprazolam, přípravek Neurol<sup>®</sup> 0,25 mg (Zentiva, ČR)

### 3.4 Seznam analyzovaných vzorků

- ČOV Brno - Modřice
  - odpadní voda z přítoku a odtoku ve dnech 26. – 30. 4. 2017
- ČOV A
  - odpadní voda z přítoku, aktivační nádrže a odtoku dne 3. 5. 2017
- ČOV B
  - odpadní voda z přítoku, aktivační nádrže a odtoku dne 3. 5. 2017

### 3.5 Postup analýzy

#### 3.5.1 Odběr vzorků

Odběry vzorků odpadní vody v ČOV Brno - Modřice byly realizovány ve dnech 26. – 30. 5. 2017, a to každý den z přítoku a odtoku. Každý vzorek o objemu 1 litr byl získán jako 24-hodinový směsný vzorek smísením 12 průtokově závislých dílčích vzorků odebíraných po 2 hodinách. Směsný vzorek byl umístěn do tmavých skleněných lahví naplněných po okraj. Odebrané vzorky byly do provedení analýzy uskladněny maximálně 72 hodin v chladničce při teplotě 4 °C.

Vzorky z ČOV A a ČOV B byly získány jako prosté vzorky, které byly odebrány 3. 5. 2017 po 1 litru do plastových lahví naplněných po okraj; z každé ČOV byly odebrány vzorky z přítoku, aktivační nádrže a odtoku. Pracovníci těchto ČOV požadovali, aby v závěrečné práci nebyla uvedena přesná lokalita.

#### 3.5.2 Extrakce tuhou fází (SPE)

Z každého odebraného vzorku o objemu 1 l bylo přibližně 500 ml filtrováno přes kvalitativní papírový filtr kruhový KA 4, průměr 150 mm (Papírna Pernštejn s.r.o., Česká republika) a následně přes filtr ze skleněných vláken MN GF 1, průměr 55 mm (Macherey-Nagel, Německo). Ze získaného filtrátu byly odebrány dva podíly o objemech po 200 ml pro možnost paralelního stanovení každého vzorku dvakrát. Jednotlivé 200ml podíly byly zakoncentrovány metodou SPE za použití kolonek Supel<sup>TM</sup>-Select HLB, 200 mg, 6 ml (Sigma-Aldrich, Německo) postupem uvedeným v tabulce (Tabulka 4).

*Tabulka 4: Zvolený postup SPE*

<b>Kondicionace sorbentu</b>	4 ml acetonitrilu a 4 ml Milli-Q vody, průtok přibližně 1 ml/min
<b>Nanesení vzorku</b>	200 ml, průtok přibližně 5 ml/min
<b>Promytí</b>	3 ml 50% methanolu (roztok v Milli-Q vodě, v/v)
<b>Sušení</b>	proudem vzduchu přibližně 20 min
<b>Eluce</b>	2 × 2 ml methanolu
<b>Odpaření</b>	proudem dusíku při 40 °C
<b>Doplnění</b>	1 ml methanolu

### 3.5.3 Kvantitativní stanovení pomocí UHPLC

Methanolové extrakty o objemech 1 ml byly filtrovány přes stříkačkové filtry LUT SyringeFilters PTFE, 0,45 µm (Labicom, Česká republika) a CronusSyringeFilters Nylon; 0,2 µm (SMI-LabHut, Velká Británie) do 2ml vialek. Následně byly podrobeny kvantitativnímu stanovení pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie na kapalinovém chromatografu Agilent 1290 Infinity (Agilent, USA) s kolonou ZORBAX EclipsePlus SB-C18 o rozměrech 2,1 × 100 mm a velikosti částic 1,8 µm (Agilent, USA). K detekci byl použit detektor s diodovým polem. Chromatografické podmínky uvádí Tabulka 5.

**Tabulka 5:** Souhrn optimálních chromatografických podmínek

<b>Nástřik</b>	1,0 µl
<b>Teplota kolony</b>	25,00 °C
<b>Průtok mobilní fáze</b>	0,300 ml/min
<b>Mobilní fáze</b>	0,1% vodný roztok (Milli-Q) kyseliny trifluoroctové (TFA) + acetonitril (ACN)
<b>Typ eluce</b>	gradientová
<b>Gradient</b>	čas [min]                      TFA [%]                      ACN [%]
	0                                      95                                      5
	7,2                                    5                                      95
	10,0                                  5                                      95
	11,5                                  95                                    5
<b>Vlnové délky</b>	222,0; 236,0; 240,0 a 230,0 nm

Kvalitativní charakteristikou jednotlivých analytů při separaci na koloně je retenční čas, kvantitativní charakteristikou je plocha píku po integraci. Každá látka má rovněž své unikátní absorpční spektrum. Sledování spekter jednotlivých separovaných látek bylo využito jako doplňková kvalitativní charakteristika a pro kvantitativní vyhodnocení každého z analytů byl využit chromatogram snímáný při vlnové délce absorpčního maxima v UV oblasti příslušného analytu. Kvalitativní chromatografické charakteristiky sledovaných analytů za daných podmínek uvádí Tabulka 6.

**Tabulka 6:** Souhrn HPLC charakteristik studovaných analytů ( $R_t$  – retenční čas,  $\lambda_{\max}$  – vlnová délka absorpčního maxima)

Léčivo	alprazolam	bromazepam	diazepam	oxazepam
$R_t$ [min]	4,964	3,469	4,747	4,577
$\lambda_{\max}$ [nm]	222,0	236,0	240,0	230,0

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Optimalizace systému UHPLC

Měření bylo provedeno ultraúčinnou kapalinovou chromatografií pomocí přístroje Agilent 1290 Infinity (Agilent, USA) s kolonou ZORBAX EclipsePlus SB-C18 o rozměrech  $2,1 \times 100$  mm a velikosti částic  $1,8 \mu\text{m}$  (Agilent, USA). Všechny vzorky byly před měřením filtrovány přes stříkačkové filtry LUT SyringeFilters PTFE,  $0,45 \mu\text{m}$ , (Labicom, Česká republika) a následně přes CronusSyringeFilters Nylon;  $0,2 \mu\text{m}$ , (SMI-LabHut, Velká Británie).

#### 4.1.1 Příprava zásobních roztoků

Jako rozpouštědlo pro přípravu roztoků byl ve všech případech použit methanol pro HPLC analýzu o čistotě  $\geq 99,8 \%$  (J. T. Baker<sup>®</sup>, Nizozemsko).

25 ml zásobního roztoku diazepamů o koncentraci 1 mg/ml bylo připraveno ze standardu o čistotě  $\geq 98 \%$  (Sigma-Aldrich, Německo).

Zásobní roztoky alprazolamu, bromazepamů a oxazepamů byly připraveny extrakcí účinných látek z léčivých přípravků dostupných v ČR ve formě tablet. Bromazepam byl extrahován z přípravku Lexaurin<sup>®</sup> 1,5 mg (Krka, ČR), oxazepam z přípravku Oxazepam Léčiva 10 mg (Zentiva, ČR) a alprazolam z přípravku Neurol<sup>®</sup> 0,25 mg (Zentiva, ČR). Příslušný počet tablet obsahující potřebnou navážku sledované látky byl rozmělněn na jemný prášek a extrahován přibližně do 60 ml methanolu v ultrazvukové vodní lázni Teson 4 (Tesla, Česká republika) po dobu přibližně 30 minut. Methanolvý extrakt byl oddělen od nerozpuštěného podílu centrifugací v centrifuze EBA 20 (Hettich, Německo), částečně odpařen na rotační vakuové odparce Rotavapor (Büchi, Švýcarsko) a poté doplněn methanolem na objem 10 ml. Předpokládaná výtěžnost extrakce byla 100 %.

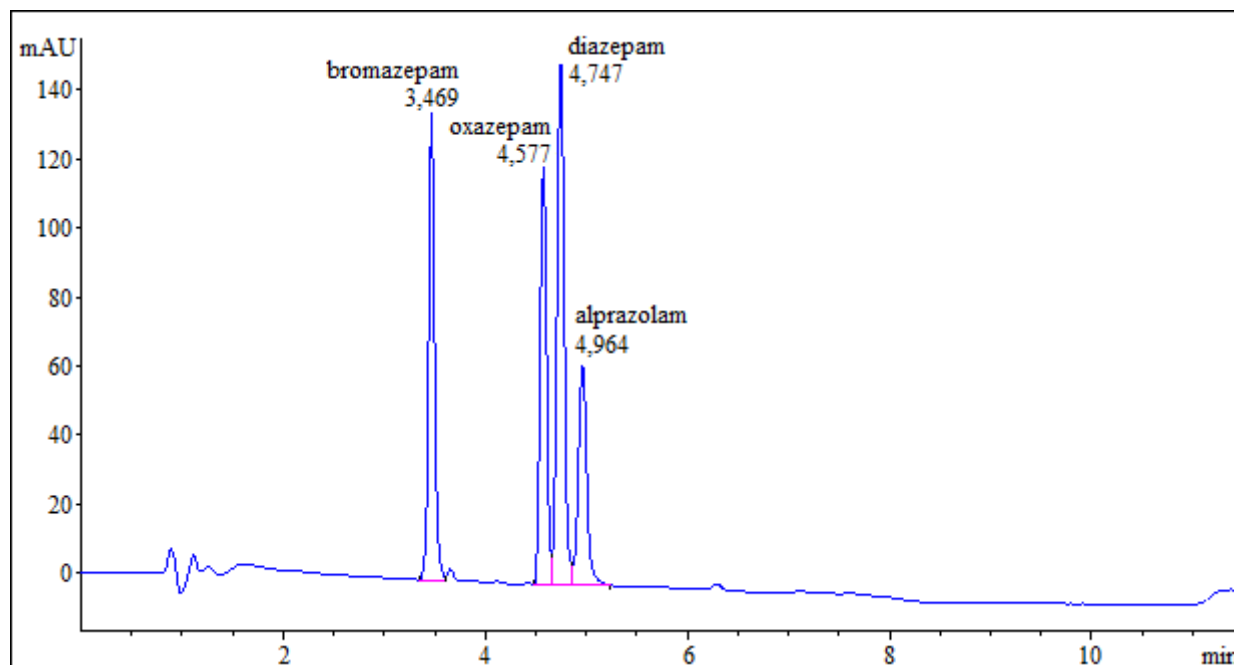
Z připravených zásobních roztoků bylo připraveno rovněž 10 ml společného zásobního roztoku o koncentraci  $100 \mu\text{g/ml}$  každé z látek. Seznam připravených zásobních roztoků uvádí Tabulka 7.

**Tabulka 7:** Celkový seznam připravených zásobních roztoků

Léčivo	koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Diazepam	1 000,0
Bromazepam	450,0
Oxazepam	1 000,0
Alprazolam	200,0
Společný roztok	100,0

#### 4.1.2 Základní HPLC charakteristiky analytů

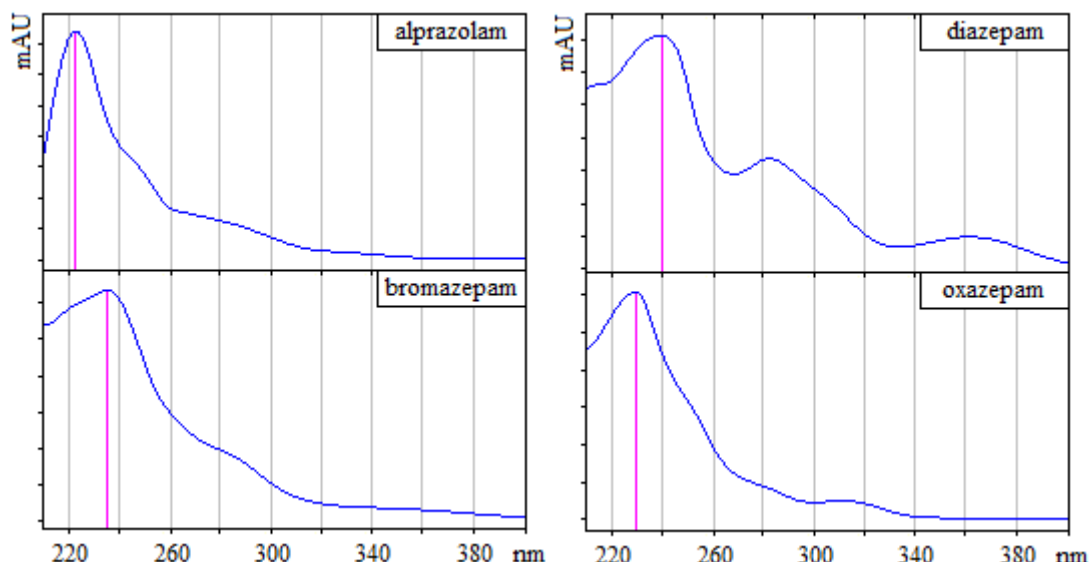
Na optimalizaci podmínek HPLC systému byl použit roztok o koncentraci 40 µg/ml; byla sledována odezva při 240 nm. Chromatogram získaný za optimálních chromatografických podmínek (viz Tabulka 5) je zobrazen na Obr. č. 23.



**Obr. č. 23:** Chromatogram směsi studovaných analytů získaný měřením za optimálních podmínek

V rámci měření byla z důvodu zjištění absorpčních maxim stanovovaných látek rovněž zaznamenávána kontinuálně UV spektra v rozsahu vlnových délek 210,0 až 400,0 nm po kroku 2,0 nm, a to za účelem pozdějšího dosažení co nejnižších mezí detekce. Přehled získaných spekter zobrazuje Obr. č. 24.





**Obr. č. 24:** UV spektra sledovaných benzodiazepinů v rozmezí vlnových délek 210 až 400 nm se zvýrazněním absorpčních maxim

#### 4.1.3 Chromatografické podmínky

Pro měření byla zvolena gradientová eluce; pro vytvoření gradientu byl použit acetonitril (ACN) a 0,1% vodného roztoku (Milli-Q) kyseliny trifluoroctové (TFA). Složení mobilní fáze bylo na počátku eluce 95 % TFA a 5 % ACN (v/v), nastavením gradientu na 12,5 % za minutu bylo během 7,2 min (7 min 12 s) dosaženo složení 5 % TFA a 95 % ACN; toto složení bylo ponecháno do doby 10,0 min a následně do 11,5 min (11 min 30 s) bylo opět změněno na výchozí poměr.

Odezva detektoru sledována paralelně při vlnových délkách 222,0 nm, 230,0 nm, 236,0 nm a 240,0 nm.

Teplota kolony byla 25,00 °C, nástřik 1,0 µl, průtok 0,300 ml/min.

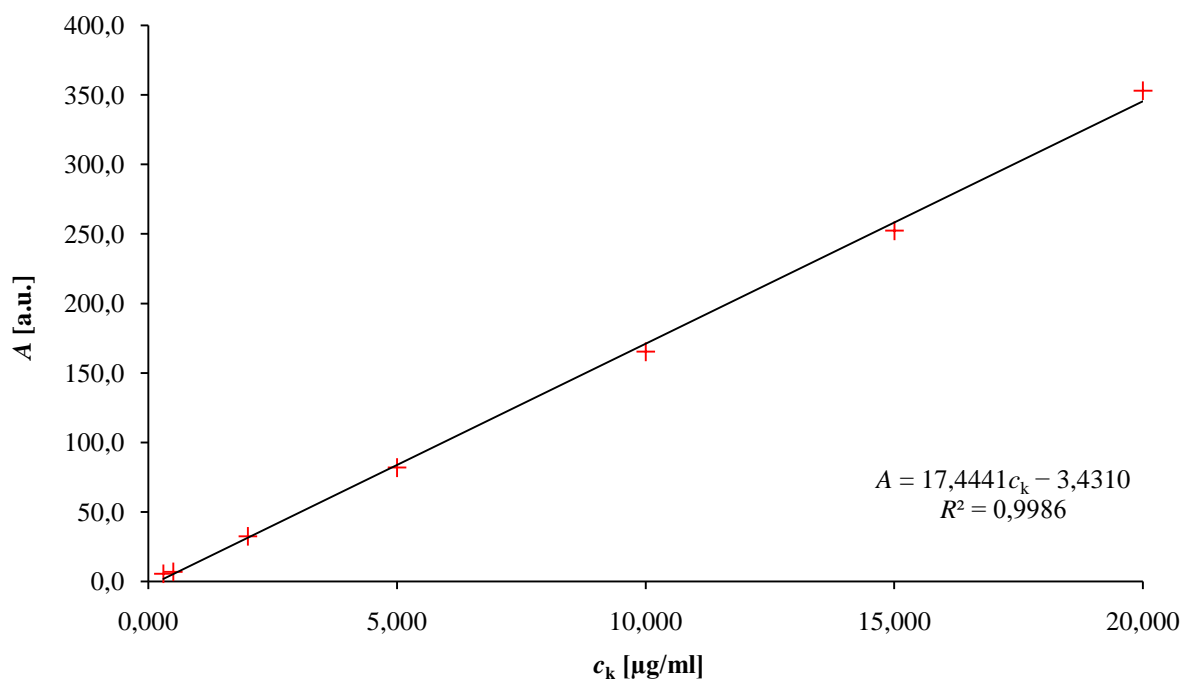
#### 4.1.4 Kalibrace

Ředěním společného zásobního roztoku o koncentraci 100 µg/ml methanolem bylo připraveno 14 kalibračních bodů v rozmezí 0,1 až 40 µg/ml (viz Tabulka 8). Na základě odezev při příslušných vlnových délkách absorpčních maxim sledovaných analytů byly vybrány kalibrační řady pro každý analyt zvlášť a to tak, že byl vybrán nejnižší kalibrační bod s dostatečnou odezvou a následujících 6 bodů, celkem tedy každou kalibrační řadu tvořilo 7 bodů.

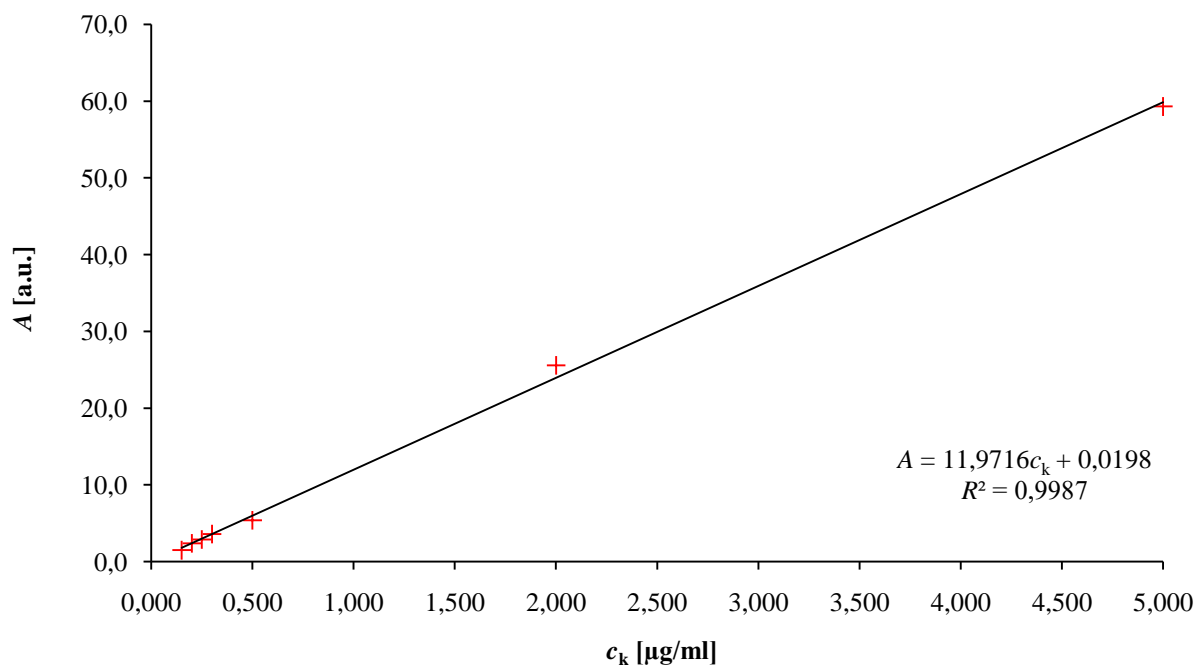
**Tabulka 8:** Vybrané rozmezí kalibračních závislostí pro jednotlivé analyty

$c_k$ [µg/ml]	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,5	2	5	10	15	20	25	30	35	40
Alprazolam															
Bromazepam															
Diazepam															
Oxazepam															

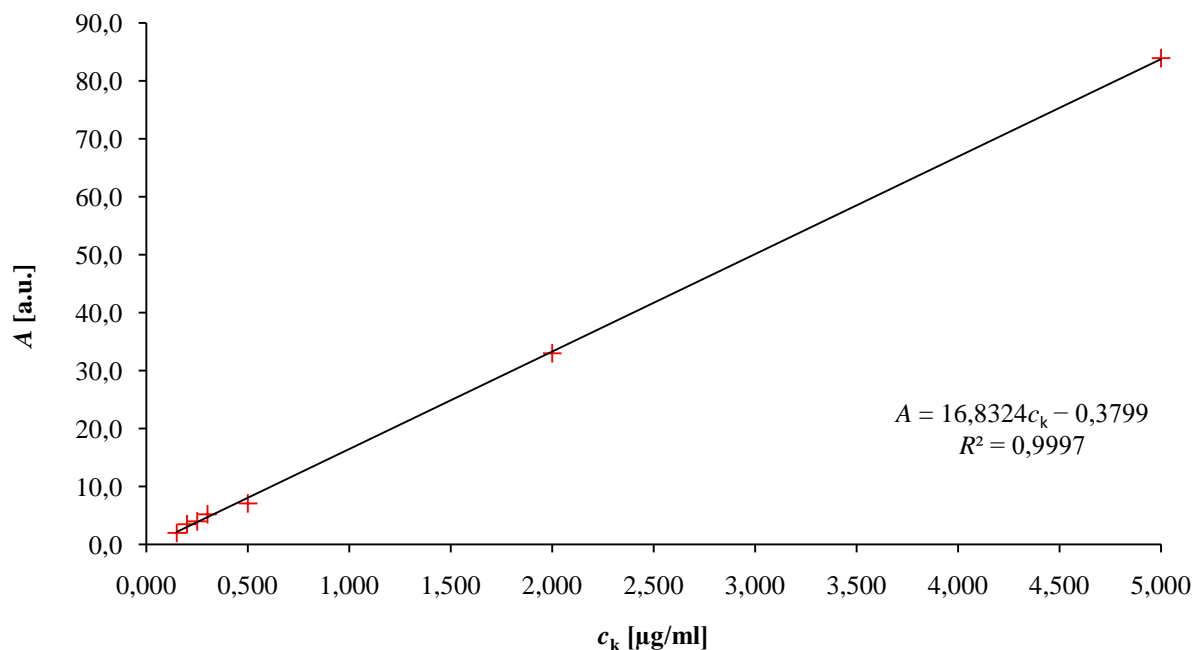
Kalibrační přímky jsou zobrazeny na Obr. č. 25 až Obr. č. 28.  $A$  představuje plochu píku,  $c_k$  je koncentrace kalibračního roztoku.



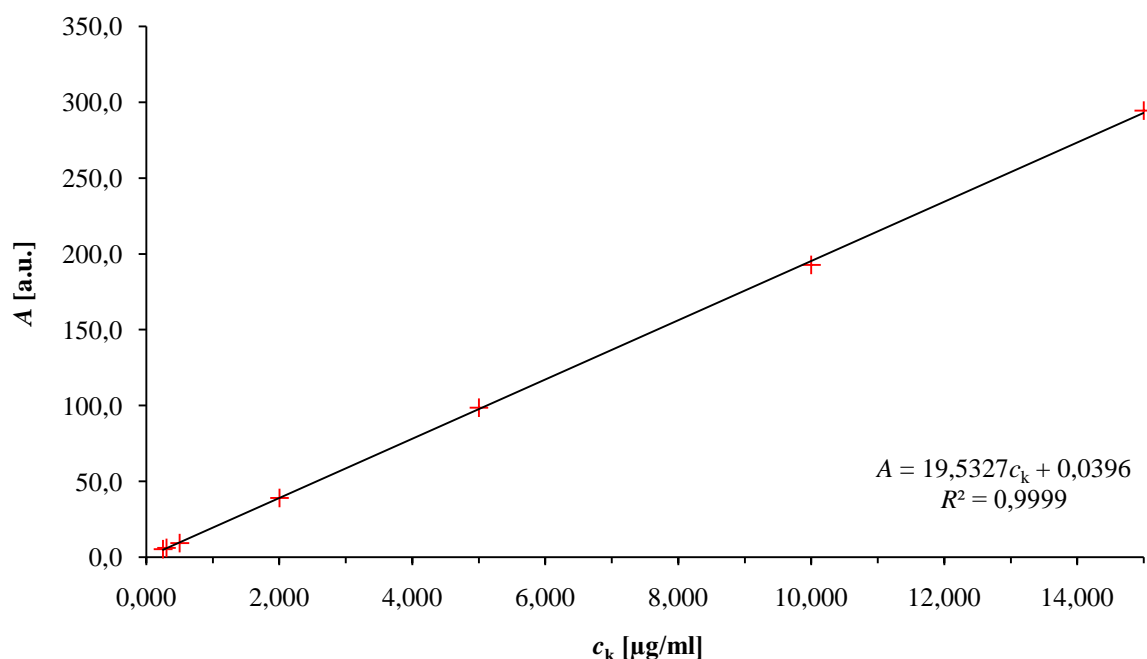
**Obr. č. 25:** Kalibrační přímka alprazolamu



**Obr. č. 26:** Kalibrační přímka bromazepamu



**Obr. č. 27:** Kalibrační přímka diazepam



**Obr. č. 28:** Kalibrační přímka oxazepam

#### 4.1.5 Limit detekce a limit kvantifikace

Limit detekce (LOD – Limit of Detection) je nejnižší koncentrace analytu, která generuje takový signál, který je statisticky odlišný od výšky šumu  $N$  základní linie. Limit kvantifikace (LOQ – Limit of Quantification) je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze danou metodou spolehlivě kvantifikovat. Uzančně je v případě chemických dělicích metod za LOD považován trojnásobek výšky šumu a za LOQ desetinásobek výšky šumu [25].

Pro výpočet LOD a LOQ byly změřeny příslušné kalibrační roztoky o nejnižší koncentraci  $c_k$  zahrnuté v kalibraci příslušných analytů. Bylo náhodně vybráno deset píků šumu základní linie a změřena jejich výška, tyto výšky byly zprůměrovány na hodnotu  $N$  [mAU]. Dále byla změřena výška píku sledovaného analytu  $S$  [mAU]. Na základě přímé úměrnosti mezi výškou píku a koncentrací byly sestaveny rovnice (3) a (4) pro výpočet LOD a LOQ. Byla-li vypočtená hodnota LOQ nižší, než koncentrace nejnižšího kalibračního bodu, byla za hodnotu LOQ považována hodnota nejnižšího kalibračního bodu.

$$\text{LOD} = 3 \cdot N \cdot \frac{c_k}{S} \text{ [}\mu\text{g/ml]} \quad (3)$$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot N \cdot \frac{c_k}{S} \text{ [}\mu\text{g/ml]} \quad (4)$$

Následně byly získané hodnoty LOD a LOQ přepočítány na reálný objem vzorku 1 litr a započtena výtěžnost SPE dle rovnice (8). Takto zjištěné limity detekce a limity kvantifikace uvádí Tabulka 9.

**Tabulka 9: Hodnoty LOD a LOQ**

Léčivo	LOD [ $\mu\text{g/l}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g/l}$ ]
<b>Alprazolam</b>	0,392	1,531
<b>Bromazepam</b>	0,109	0,789
<b>Diazepam</b>	0,329	1,096
<b>Oxazepam</b>	0,258	1,276

## 4.2 Extrakce tuhou fází (SPE)

### 4.2.1 Výběr kolonek a promývacího a elučního činidla

Při výběru kolonek byly zohledněny vlastnosti analyzované matrice (voda) a sledovaných analytů (vysoce lipofilní organické látky). Na základě údajů od výrobce byly předběžně zvoleny kolonky Supel<sup>TM</sup>-Select HLB, 200 mg, 6 ml (Sigma-Aldrich, Německo) – sorbentem je hydrofilně modifikovaný polystyren; je proto vhodný pro extrakci hydrofilních i lipofilních látek z vodných matric a zejména je výrobcem doporučen pro extrakci léčiv. Studium literatury bylo rovněž zjištěno časté použití kolonek typu HLB pro paralelní stanovení více druhů léčiv ve vodných matricích [28], [31].

Cílem tohoto kroku bylo rovněž nalézt vhodné promývací činidlo, které zajistí vymytí lipofilních balastních látek, a přitom zároveň nedojde k vymytí sledovaných analytů z SPE kolonek. Rovněž bylo cílem ověřit vhodnost methanolu jako elučního činidla; vycházelo se z faktu, že sledované analyty jsou v methanolu dobře rozpustné.

SPE kolonka Supel<sup>TM</sup>-Select HLB 200 mg byla kondicionována 4 ml acetonitrilu a následně 4 ml Milli-Q vody, průtok byl přibližně 1 ml/min. Následně bylo na kolonku nanášeno 200 ml Milli-Q vody obohacené o 600  $\mu\text{g}$  diazepamů při průtoku přibližně 5 ml/min. Eluce v několika krocích za sebou s využitím roztoků methanolu v Milli-Q vodě o různých koncentracích, v každém kroku byly použity 3 ml elučního činidla. Protože k provedení

UHPLC analýzy je vhodné eliminovat interference v reálném vzorku na minimum, bylo cílem použít promývací činidlo s co nejvyšším obsahem methanolu (a tedy s co nejvyšší eluční silou, aby bylo dosaženo efektivního vymytí balastních látek) a zároveň zachování co největšího podílu analytu na kolonce. Výsledek uvádí Tabulka 10.

**Tabulka 10:** Výťažnost SPE na kolonce Supel<sup>TM</sup>-Select HLB 200 mg, *m* je množství analytu vyeluovaného v daném kroku

koncentrace methanolu [obj. %]	<i>m</i> [μg]
0	14,58
5	9,27
30	6,10
50	5,56
100	413,5
nezachyceno nebo nevyeluováno	151,0
<b>výtěžnost</b>	<b>73,05 %</b>

Orientačně zjištěná výtěžnost metody byla vypočtena jako součet hmotností získaných elucemi vyjádřený jako procento z původního množství 600 μg. Výtěžnost 73,05 % byla považována za dostatečnou a kolonky Supel<sup>TM</sup>-Select HLB byly použity k další analýze. Jako promývací činidlo byl zvolen 50% methanol, při jehož použití stále ještě nedocházelo ke zvýšenému uvolňování analytu ze sorbentu.

#### 4.2.2 Optimalizace promytí a eluce

Čtyři vzorky po 200 ml Milli-Q vody obohacené o všechny 4 analyty po 120 μg byly zachyceny na kolonkách Supel<sup>TM</sup>-Select HLB, 200 mg. Vzorky byly promyty 50% methanolem po 3 ml nebo 2 × po 2 ml, následně eluovány 100% methanolem taktéž po 3 ml nebo 2 × po 2 ml. Byla změřena koncentrace analytů v eluátech a vypočtena výtěžnost postupů (viz Tabulka 11).

**Tabulka 11:** Výtěžnost různých postupů extrakce léčiv

Léčivo	č. postupu	promytí 50% methanolem	eluce 100% methanolem	výtěžnost [%]
<b>Alprazolam</b>	1	3 ml	3 ml	94
	2	2 × 2 ml	2 × 2 ml	91
	3	3 ml	2 × 2 ml	<b>98</b>
	4	2 × 2 ml	3 ml	85
<b>Bromazepam</b>	1	3 ml	3 ml	85
	2	2 × 2 ml	2 × 2 ml	81
	3	3 ml	2 × 2 ml	<b>91</b>
	4	2 × 2 ml	3 ml	71
<b>Diazepam</b>	1	3 ml	3 ml	69
	2	2 × 2 ml	2 × 2 ml	70
	3	3 ml	2 × 2 ml	<b>74</b>
	4	2 × 2 ml	3 ml	60
<b>Oxazepam</b>	1	3 ml	3 ml	85
	2	2 × 2 ml	2 × 2 ml	88
	3	3 ml	2 × 2 ml	<b>93</b>
	4	2 × 2 ml	3 ml	82

Výtěžnost extrakce všech léčiv na kolonkách Supel<sup>TM</sup>-Select HLB 200 mg byla nejvyšší při promytí 3 ml 50% methanolu a následné eluci 2 × 2 ml 100% methanolu. Posledním krokem optimalizace SPE bylo zjištění přesné výtěžnosti metody pomocí opakovaných měření (kapitola 4.2.3).

#### 4.2.3 Výtěžnost metody

Šest vzorků Milli-Q vody po 200 ml obohacených všemi čtyřmi sledovanými analyty po 40 µg bylo podrobena extrakci na zvolených kolonkách za podmínek uvedených v tabulce (Tabulka 4). Maximální koncentrace  $c_{\max}$  extraktu o objemu 1 ml byla tedy 40 µg/ml.

Měřením na UHPLC při již deklarovaných podmínkách byly zjištěny koncentrace benzodiazepinů  $c$  ve vzorcích získaných extrakcí tuhou fází, a to výpočtem pomocí příslušných rovnic regrese. Byly vypočteny průměrné koncentrace výtěžku  $c_p$  pro každou látku, absolutní odchylka  $\Delta c$  a relativní odchylka  $\delta c$ :

$$\Delta c = |c_p - c| \text{ [}\mu\text{g/ml]} \quad (5)$$

$$\delta c = \frac{\Delta c}{c_p} [\%] \quad (6)$$

Hodnoty koncentrací  $c$  s relativní odchylkou od průměru  $\delta c$  nižší než 10 % byly znovu zprůměrovány, čímž byla získána hodnota  $c_p'$ . Výťažnost extrakce  $x$  byla vypočtena podle vztahu:

$$x = \frac{c_p'}{c_{\max}} \cdot 100 [\%] \quad (7)$$

Tabulka 12 až Tabulka 15 uvádějí data pro výpočet výtěžnosti SPE sledovaných analytů, která byla stanovena pomocí UHPLC.

**Tabulka 12:** Výtěžnost SPE – Alprazolam

č. měření	$c$ [μg/ml]	$\Delta c$ [μg/ml]	$\delta c$ [%]
1	38,80	0,57	1,44
2	41,30	1,93	4,90
3	42,14	2,78	7,05
4	36,21	3,16	8,02
5	42,87	3,51	8,91
6	34,88	4,49	11,41
	$c_p$ [μg/ml]	$c_p'$ [μg/ml]	$x$ [%]
	38,52	39,40	98,50

**Tabulka 13:** Výtěžnost SPE – Bromazepam

č. měření	$c$ [μg/ml]	$\Delta c$ [μg/ml]	$\delta c$ [%]
1	36,41	0,56	1,52
2	38,10	1,12	3,03
3	38,92	1,94	5,26
4	34,48	2,49	6,74
5	40,35	3,38	9,14
6	33,59	3,39	9,16
	$c_p$ [μg/ml]	$c_p'$ [μg/ml]	$x$ [%]
	38,15	38,15	95,37

**Tabulka 14:** Výtěžnost SPE – Diazepam

č. měření	$c$ [μg/ml]	$\Delta c$ [μg/ml]	$\delta c$ [%]
1	29,09	0,31	1,05
2	28,54	0,86	2,93
3	27,86	1,54	5,24
4	32,18	2,78	9,46
5	35,52	6,12	20,82
6	23,21	6,19	21,06
	$c_p$ [μg/ml]	$c_p'$ [μg/ml]	$x$ [%]
	29,46	29,48	73,70

**Tabulka 15:** Výtěžnost SPE – Oxazepam

č. měření	$c$ [μg/ml]	$\Delta c$ [μg/ml]	$\delta c$ [%]
1	39,36	1,18	3,08
2	37,00	1,19	3,11
3	40,52	2,33	6,10
4	34,32	3,87	10,12
5	33,89	4,30	11,23
6	44,03	5,84	15,30
	$c_p$ [μg/ml]	$c_p'$ [μg/ml]	$x$ [%]
	38,27	39,05	97,61

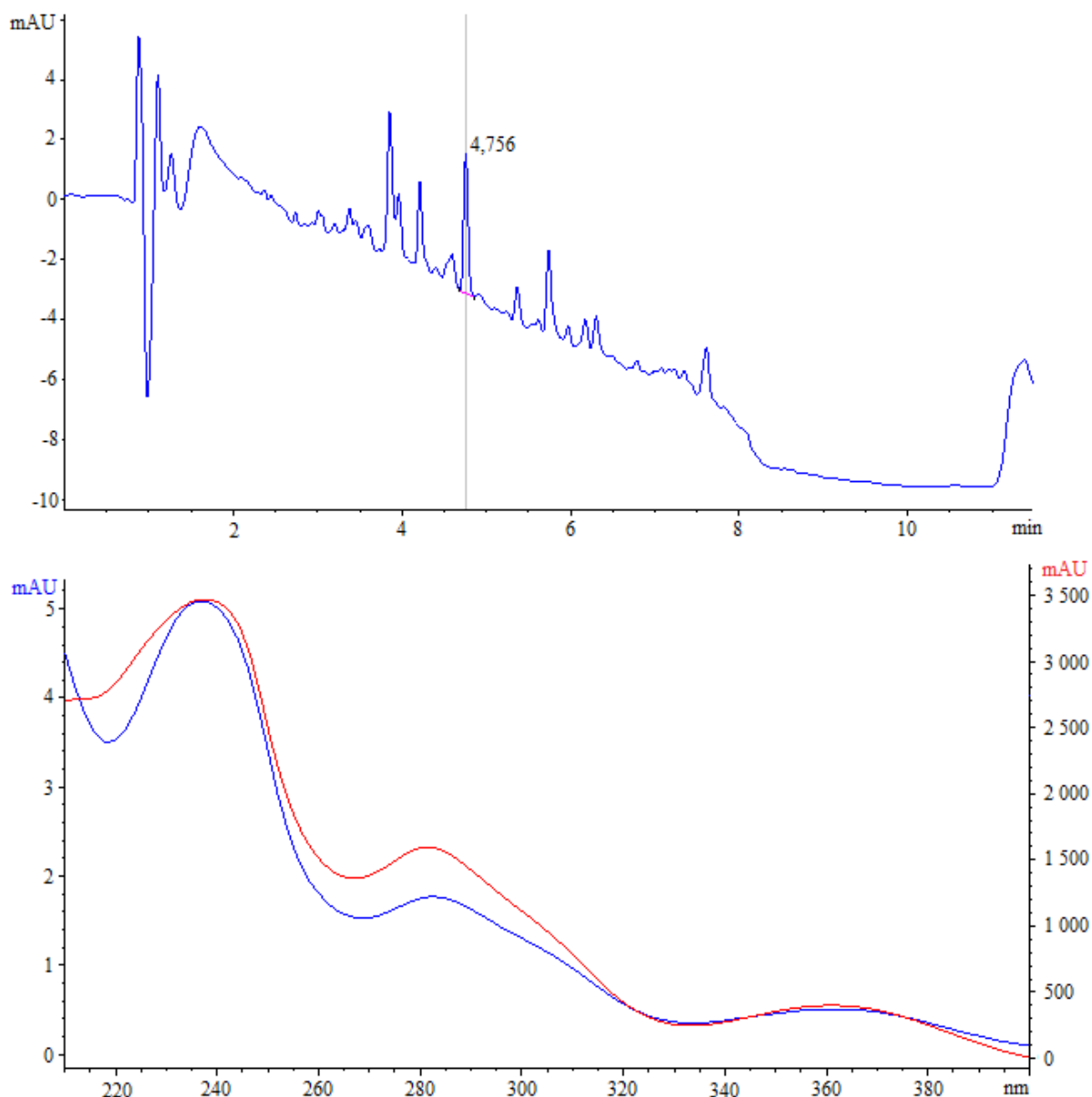
Bylo zjištěno, že výtěžnosti zvoleného postupu SPE jsou následující: alprazolam 98,50 %, bromazepam 95,37 %, diazepam 73,70 % a oxazepam 97,61 %.

### 4.3 Měření reálných vzorků

Všechny měřené vzorky byly stanoveny paralelně dvakrát a získané hodnoty byly zprůměrovány.

Vzorky zakoncentrované metodou SPE byly kvantitativně analyzovány pomocí UHPLC s UV detekcí s využitím detektoru s diodovým polem. Pro výpočet koncentrace každé z látek byl vyhodnocen chromatogram získaný odezvou detektoru při vlnové délce příslušného absorpčního maxima, tj. při 240 nm pro diazepam, 236 nm pro bromazepam, 230 nm pro oxazepam a 222 nm pro alprazolam. Pro vyhodnocení byly vzaty příslušné píky na základě odpovídajícího retenčního času; píky těchto analytů byly následně ověřeny pomocí zaznamenaného UV spektra za účelem zjištění, zda jednoznačně odpovídají sledované látce. Příklad postupu vyhodnocení je na Obr. č. 29.





**Obr. č. 29:** Chromatogram vzorku „Modřice 24. 6. 2017 odtok“ (v horní části obrázku), absorbance [mAU] při 240 nm, kvantifikace diazepamu ( $R_t = 4,756$  min). V dolní části obrázku je vyobrazeno absorpční spektrum eluátu v čase 4,756 min (modře) a absorpční spektrum standardu diazepamu (červeně) pro porovnání.

#### 4.3.1 Obsah léčiv ve vzorcích odpadních vod

Kvantifikace byla provedena na základě výpočtu za pomoci příslušné kalibrační rovnice, kde z naměřené plochy píku byla zjištěna koncentrace 1 ml methanolového extraktu odpovídající koncentraci  $c_k$  [ $\mu\text{g/ml}$ ] podle kalibrace, přičemž množství analytu v tomto extraktu odpovídá množství analytu ve 200 ml reálného vzorku bez zohlednění výtěžnosti SPE. Po zohlednění výtěžnosti SPE  $x$  [%], použitého objemu vzorku  $V_1 = 200$  ml a celkového objemu vzorku  $V_2 = 1000$  ml, což je pětinasobek, byl získán vztah pro výpočet reálné koncentrace:

$$c = c_k \cdot \frac{100}{x} \cdot 5 \text{ } [\mu\text{g/l}]. \quad (8)$$

Tabulka 16 – Tabulka 18 uvádějí naměřené koncentrace léčiv v jednotlivých ČOV. „ND“ v tabulce znamená, že látka nebyla ve vzorku detekována, „< LOQ“ znamená naměřenou hodnotu pod limitem kvantifikace.

**Tabulka 16:** Naměřené koncentrace léčiv v ČOV Brno - Modřice

Den odběru	místo odběru	koncentrace [µg/l]			
		alprazolam	bromazepam	diazepam	oxazepam
26.4.2017	přítok	ND	ND	2,033	ND
	odtok	<LOQ	ND	5,793	2,380
27.4.2017	přítok	ND	ND	5,170*	ND
	odtok	ND	ND	2,160*	2,941*
28.4.2017	přítok	ND	ND	ND	ND
	odtok	ND	ND	3,159*	3,512*
29.4.2017	přítok	ND	ND	ND	ND
	odtok	ND	ND	ND	2,054*
30.4.2017	přítok	ND	ND	ND	ND
	odtok	ND	ND	ND	ND

**Tabulka 17:** Naměřené koncentrace léčiv v ČOV A

Den odběru	místo odběru	koncentrace [µg/l]			
		alprazolam	bromazepam	diazepam	oxazepam
3.5.2017	přítok	ND	ND	ND	ND
	aktivační nádrž	ND	ND	1,919*	ND
	odtok	ND	ND	3,679	ND

**Tabulka 18:** Naměřené koncentrace léčiv v ČOV B

Den odběru	místo odběru	koncentrace [µg/l]			
		alprazolam	bromazepam	diazepam	oxazepam
3.5.2017	přítok	ND	ND	ND	ND
	aktivační nádrž	ND	ND	ND	ND
	odtok	<LOQ	ND	3,179	ND

Opakovaně byla detekována přítomnost diazepamu a oxazepamu ve sledovaných odpadních vodách, a to i na odtoku z ČOV. Alprazolam byl v několika případech detekován, koncentrační hodnoty však nedosahovaly meze kvantifikace. Bromazepam nebyl detekován v žádném ze sledovaných vzorků. V mnoha případech, zejména při měření vzorků z přítoků, nedocházelo na koloně k dostatečnému oddělení léčiv v důsledku složitosti matrice. V měřených vzorcích bylo přítomno vysoké množství interferujících látek, jejichž odezva na detektoru mnohonásobně převyšovala odezvu sledovaných analytů a znemožňovala tak jejich detekci. Nelze proto na základě získaných dat posoudit účinnost čistíren při odstraňování léčiv z odpadních vod.

Předmětem dalšího zkoumání by proto mohlo být vylepšení prekoncentračního kroku pomocí zefektivnění SPE, zejména zvýšení selektivity při extrakci. K tomu by mohly sloužit

SPE kolonky s tuhou fází na bázi molekulárně vtištěných polymerů. V současnosti jsou již na trhu tyto kolonky pro řadu léčiv, pro selektivní extrakci benzodiazepinů však dosud chybí.

Další variantou by bylo použít stávající metodu SPE, avšak kvantifikaci provést pomocí metod majících nižší meze detekce, například LC-MS.

#### 4.3.2 Vyhodnocení rizik

Vyhodnocení rizik zejména pro ekosystém recipientu (řeky Svratky, a dvou dalších recipientů) spojených s výskytem sledovaných léčiv v odpadních vodách byla vypočítána hodnota HQ jako podíl stanovené koncentrace léčiv a hodnot PNEC pro vodní ekosystém zjištěných v literatuře (viz kapitola 2.1.3.1). Hodnoty HQ prezentují Tabulka 19 – Tabulka 21 a hodnoty vyšší než 1 jsou v tabulkách zvýrazněny.

**Tabulka 19:** Vypočítané hodnoty HQ pro koncentraci léčiv nalezených v ČOV Brno - Modřice

Den odběru	místo odběru	HQ			
		alprazolam	bromazepam	diazepam	oxazepam
26.4.2017	přítok	-	-	1,017	-
	odtok	-	-	2,897	0,553
27.4.2017	přítok	-	-	2,585*	-
	odtok	-	-	1,080*	0,684*
28.4.2017	přítok	-	-	-	-
	odtok	-	-	1,580*	0,817*
29.4.2017	přítok	-	-	-	-
	odtok	-	-	-	0,478*
30.4.2017	přítok	-	-	-	-
	odtok	-	-	-	-

**Tabulka 20:** Vypočítané hodnoty HQ pro koncentraci léčiv nalezených v ČOV A

Den odběru	místo odběru	HQ			
		alprazolam	bromazepam	diazepam	oxazepam
3. 5. 2017	přítok	-	-	-	-
	aktivační nádrž	-	-	0,960*	-
	odtok	-	-	1,840	-

**Tabulka 21:** Vypočítané hodnoty HQ pro koncentraci léčiv nalezených v ČOV B

Den odběru	místo odběru	HQ			
		alprazolam	bromazepam	diazepam	oxazepam
3.5.2017	přítok	-	-	-	-
	aktivační nádrž	-	-	-	-
	odtok	-	-	1,590	-

\* Tyto hodnoty nebyly získány jako průměr dvou hodnot, neboť ve druhém paralelně měřeném vzorku nebylo možno obsah látky kvantifikovat díky složitosti matrice. Je tedy uvedena pouze jedna naměřená hodnota.

Bylo zjištěno, že v několika případech je možné na základě předchozích úvah hovořit o potenciálním riziku v důsledku přesažení hodnoty  $HQ = 1$  na odtoku ze sledovaných ČOV. Toto riziko by se týkalo biologické rovnováhy zejména v příslušných recipientech a jejich okolí, ovšem nutno vzít v úvahu, že voda přitékající do vodního útvaru z ČOV je v tekoucích vodách rychle rozptýlena, zředěna a objemové koncentrace látek obsažených v odpadní vodě jsou tak značně sníženy. Může však docházet k imobilizaci těchto látek ve vodních útvarech sorpcí na sedimenty, neboť se ukázalo, že benzodiazepiny se na sedimenty sorbují velmi rychle a v této formě jsou vysoce perzistentní, stejně jako při jejich výskytu v půdách [35].

V důsledku sorpce na sedimenty sice dochází k přirozenému čištění povrchových vod, avšak v případě, pokud je látka přítomná v sedimentech rovněž perzistentní, může její množství v sedimentech časem vzrůstat a vyvolat riziko pro živé organismy v sedimentu, čímž dojde k přímému ovlivnění ekosystému celého vodního útvaru. Pro zjištění více informací by bylo vhodné rozšířit výzkum o stanovení těchto látek v povrchových vodách, zejména v recipientech ČOV a stanovit obsah těchto léčiv nejen ve vodách, ale i v příslušných sedimentech.

## 5 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce byla řešena problematika výskytu léčiv v odpadních vodách. V důsledku dlouhodobého trendu meziročního nárůstu výroby a spotřeby léčiv se jedná se o aktuálně řešené téma v oblasti environmentálních věd, zejména z hlediska dopadů léčiv přítomných ve složkách životního prostředí na ekosystém. Pro sledování byla zvolena léčiva ze skupiny benzodiazepinů. Na základě informací o četnosti užívání konkrétních léčiv v Jihomoravském kraji byli sledováni čtyři zástupci, a to alprazolam, bromazepam, diazepam a oxazepam.

Vzorky odpadních vod byly odebrány v ČOV v Modřicích, která zajišťuje čištění vod pro město Brno a okolí; odběr probíhal v pěti po sobě jdoucích dnech, a to 26. – 30. 4. 2017, vždy byla voda odebírána na přítoku a na odtoku. Dále byly dne 3. 4. 2017 odebrány vzorky odpadních vod z ČOV A a ČOV B, a to z přítoku, obsahu aktivací nádrže a z odtoku.

Pro analýzu byla vybrána metoda ultraúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) s UV detekcí pomocí detektoru s diodovým polem. Pro snížení mezí detekce byla jako prekoncentrační metoda využita extrakce tuhými fázemi (SPE) na kolonkách Supel<sup>TM</sup>-Select HLB, 200 mg, 6 ml (Sigma-Aldrich, Německo).

Kvantitativní stanovení bylo provedeno s využitím kapalinového chromatografu Agilent 1290 Infinity (Agilent, USA) v systému reverzních fází na ultraúčinné koloně ZORBAX EclipsePlus SB-C18 (Agilent, USA). Kalibrace byla provedena vyhodnocením odezvy měření kalibračních roztoků standardů o sedmi koncentračních úrovních. Byly sestaveny kalibrační přímky pomocí metody nejmenších čtverců v programu MS Excel 2007. Tato metoda však neumožňovala vyhodnocení matričního efektu.

Po vyhodnocení experimentálně získaných dat bylo zjištěno, že uvedenou kombinací prekoncentrační metody a následné analytické metody nebylo dosaženo potřebných mezí detekce. Výťažnost SPE byla vysoká (73,70 až 98,50 %), avšak extrakce nebyla dostatečně selektivní pro umožnění dostatečné separace na koloně a dosažení spolehlivé detekce pomocí DAD. Předmětem dalšího výzkumu bude proto změna SPE za využití sorbentu selektivního pro léčiva, případně analýza extraktu pomocí tandemového spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, která poskytuje nižší meze detekce.

Ve sledovaných odpadních vodách byla detekována a kvantifikována přítomnost diazepamu a oxazepamu v množství jednotek  $\mu\text{g/l}$ , v několika vzorcích byla detekována přítomnost alprazolamu, avšak koncentrace byly pod limitem kvantifikace. Bromazepam nebyl detekován v žádném ze sledovaných vzorků. Získaná data však neumožňují vyhodnotit účinnost odstranění léčiv ve sledovaných ČOV, neboť ve složitých maticích přítoků vlivem nedostatečné separace analytů od balastních látek většinou nebylo možno léčiva vůbec detekovat, případně byla naměřena jejich koncentrace nižší než na odtoku, a to pravděpodobně vlivem matričního efektu.

Získané hodnoty koncentrací léčiv byly vyhodnoceny na přítomnost rizik výpočtem koeficientu rizika HQ (hazard quotient), přičemž v několika případech byla hodnota

koeficientu překročena. Vzhledem k potenciálnímu riziku by bylo vhodné v rámci dalšího sledování změřit obsah benzodiazepinů v povrchových vodách recipientu a v jejich sedimentech, neboť benzodiazepiny se na sedimenty snadno adsorbují a v této podobě vykazují perzistenci, což může vyvolat riziko ovlivnění ekosystému celého vodního útvaru.

## 6 SEZNAM LITERATURY

- [1] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 2., rozš. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-639-5.
- [2] DOSTÁLEK, Miroslav. *Farmakokinetika*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1464-7.
- [3] DOHÁNYOS, Michal, Jan KOLLER a Nina STRNADOVÁ. *Čištění odpadních vod*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-619-7.
- [4] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. ISBN 978-80-7080-701-9.
- [5] CHURÁČEK, Jaroslav. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Praha: Academia, 1993. ISBN 80-200-0010-0.
- [6] *Brněnské vodárny a kanalizace* [online]. 2017 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <http://www.bvk.cz/>
- [7] ČSN ISO 5667-10. *Jakost vod. Odběr vzorků. Část 10: Pokyny pro odběr vzorků odpadních vod*. 2007.
- [8] Technologické postupy pro zpracování odpadních kalů. *Hornicko-geologická fakulta: Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava* [online]. 2017 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: [hgfl0.vsb.cz/546/ZpracovaniKalu/postupy.html](http://hgfl0.vsb.cz/546/ZpracovaniKalu/postupy.html)
- [9] PROKEŠ, Jaroslav. *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Praha: Galén, c2005. ISBN 80-7262-301-x.
- [10] BOONJOB, Warunya. AnOverviewaboutRecentAdvancesofMicro-Solid PhaseExtraction in FlowBasedTechniques. *Austin JournalofAnalytical and PharmaceuticalChemistry* [online]. 2014, 1(2), 1-6 [cit. 2017-03-22]. ISSN 2381-8913. Dostupné z: <http://austinpublishinggroup.com/analytical-pharmaceutical-chemistry/fulltext/ajapc-v1-id1006.php>
- [11] ExtractionSystem. *Thomas Scientific* [online]. 2017 [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: [http://www.thomassci.com/Equipment/Extraction-Manifolds/\\_/SPE-12G-COLUMN-PROCESSOR](http://www.thomassci.com/Equipment/Extraction-Manifolds/_/SPE-12G-COLUMN-PROCESSOR)
- [12] Diazepam. *PubChem* [online]. 2017 [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3016>
- [13] Bromazepam. *PubChem* [online]. 2017 [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2441>
- [14] Oxazepam. *PubChem* [online]. 2017 [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4616>
- [15] Alprazolam. *PubChem* [online]. 2017 [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2118>

- [16] ATC skupiny. *SÚKL* [online]. [cit. 2017-03-24]. Dostupné z: [http://www.sukl.cz/modules/medication/atc\\_tree.php?current=N05BA#N05BA](http://www.sukl.cz/modules/medication/atc_tree.php?current=N05BA#N05BA)
- [17] Dodávky léčiv - se zaměřením na léčivé látky: Rok 2016. *SÚKL* [online]. [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/rok-2016-1>
- [18] Diazepam Slovakofarma: Příbalová informace. *SÚKL* [online]. 2016 [cit. 2017-03-24]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=PI101550.pdf&type=pil&as=diazepam-slovakofarma-pil>
- [19] Oxazepam Léčiva: Příbalová informace. *SÚKL* [online]. 2016 [cit. 2017-03-24]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=PI106819.doc&type=pil&as=oxazepam-leciva-pil>
- [20] Lexaurin: Příbalová informace. *SÚKL* [online]. 2016 [cit. 2017-03-24]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=PI101024.pdf&type=pil&as=lexaurin-3-pil>
- [21] Neurol: Příbalová informace. *SÚKL* [online]. 2016 [cit. 2017-03-24]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=PI101889.pdf&type=pil&as=neurol-0-25-pil>
- [22] ANDERSSON, Tommy, John O. MINERS, Maurice E. VERONESE a Donald E. BIRKETT. Diazepam metabolism by human liver microsomes mediated by both S-mephenytoin hydroxylase and CYP3A isoforms. *British journal of clinical pharmacology* [online]. 1994, 38(2), 131-137 [cit. 2017-03-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1364858/pdf/brjclinpharm00018-0038.pdf>
- [23] RISS, J., J. CLOYD, J. GATES a S. COLLINS. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neurologica Scandinavica* [online]. 2008, 118(2), 69-86 [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2008.01004.x. ISSN 00016314. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0404.2008.01004.x>
- [24] TONG, Alfred Y.C., Barrie M. PEAKE a Rhiannon BRAUND. Disposal practices for unused medications around the world. *Environment International* [online]. 2011, 37(1), 292-298 [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1016/j.envint.2010.10.002. ISSN 01604120. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412010002011>
- [25] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3. SWADESH, Joel. *HPLC: practical and industrial applications*. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c2001. Analytical chemistry series (CRC Press). ISBN 0-8493-0003-7.



- [26] CHRISTIAN, Gary D. a James E. O'REILLY. *Instrumental analysis*. 2nd ed. Boston: Allyn and Bacon, c1986. ISBN 0-205-08685-3.
- [27] SAXÉN, Irma a Lauri SAXÉN. Association between maternal intake of diazepam and oral clefts. *The Lancet*. 1975, 306(7933), 498.
- [28] Solid Phase Extraction Products. In: *Sigma-Aldrich®* [online]. 2017 [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General\\_Information/t402150.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/t402150.pdf)
- [29] RASHVAND, Masoumeh a Maryam VOSOUGH. Graphene oxide–polyaniline nanocomposite as a potential sorbent for dispersive solid-phase extraction and determination of selected pharmaceutical and personal care products in wastewater samples using HPLC with a diode-array detector. *Anal. Methods* [online]. 2016, **8**(8), 1898-1907 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1039/C5AY03182F. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5AY03182F>
- [30] VERLICCHI, P., M. AL AUKIDY a E. ZAMBELLO. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Science of The Total Environment* [online]. 2012, **429**, 123-155 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.028. ISSN 00489697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969712005608>
- [31] HUMMEL, Daniela, Dirk LÖFFLER, Guido FINK a Thomas A. TERNES. Simultaneous Determination of Psychoactive Drugs and Their Metabolites in Aqueous Matrices by Liquid Chromatography Mass Spectrometry †. *Environmental Science & Technology* [online]. 2006, **40**(23), 7321-7328 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1021/es061740w. ISSN 0013-936x. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es061740w>
- [32] VAN DER AA, Monique, Lubertus BIJLSMA, Erik EMKE, et al. Risk assessment for drugs of abuse in the Dutch watercycle. *Water Research* [online]. 2013, **47**(5), 1848-1857 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1016/j.watres.2013.01.013. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135413000304>
- [33] VERSTER, Joris C. a Edmund R. VOLKERTS. Clinical Pharmacology, Clinical Efficacy, and Behavioral Toxicity of Alprazolam: A Review of the Literature. *CNS Drug Reviews* [online]. 2004, **10**(1), 45-76 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1111/j.1527-3458.2004.tb00003.x. ISSN 1080563x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1527-3458.2004.tb00003.x>
- [34] BUCHER, J. Toxicity and Carcinogenicity Studies of Oxazepam in the Fischer 344 Rat. *Toxicological Sciences* [online]. 1998, **42**(1), 1-12 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1006/toxs.1997.2421. ISSN 10966080. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096608097924215>
- [35] KOSJEK, T., S. PERKO, M. ZUPANC, M. ZANOŠKI HREN, T. LANDEKA DRAGIČEVIĆ, D. ŽIGON, B. KOMPARE a E. HEATH. Environmental occurrence,

- fate and transformation of benzodiazepines in water treatment. *Water Research* [online]. 2012, **46**(2), 355-368 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1016/j.watres.2011.10.056. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135411006646>
- [36] BAUTITZ, Ivonete Rossi a Raquel F. Pupo NOGUEIRA. Photodegradation of lincomycin and diazepam in sewage treatment plant effluent by photo-Fenton process. *Catalysis Today* [online]. 2010, 151(1-2), 94-99 [cit. 2017-05-14]. DOI: 10.1016/j.cattod.2010.02.018. ISSN 09205861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092058611000101X>
- [37] Evolution of Cell Culture Surfaces. *Sigma-Aldrich®* [online]. 2008 [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/evolution-of-cell.html>
- [38] GUERRIERO, F. J.; FOX, K. A. Benzodiazepines and reproduction of swiss-webster mice. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*. 1976, 13(4), 601-610.
- [39] Česle. *BÜSCH Technology* [online]. [cit. 2017-03-05]. Dostupné z: <https://www.buesch.com/cs/vyrobky/vretenova-soupatka-hraditka-a-stavitka/prislusenstvi/cesle/>
- [40] Lapák šterku. *Podještědské gymnázium Liberec* [online]. [cit. 2017-03-05]. Dostupné z: <http://old.pglibc.cz/files/chv/COV/animace1.html>
- [41] SPE kolonky. In: *Labicom* [online]. 2017 [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: [https://www.labicom.cz/cogwpspogd/uploads/2016/07/BEplex\\_a\\_cartridges.jpg](https://www.labicom.cz/cogwpspogd/uploads/2016/07/BEplex_a_cartridges.jpg)
- [42] SupelMIP® Solid Phase Extraction. *Sigma-Aldrich®* [online]. 2014 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General\\_Information/t407075.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/t407075.pdf)
- [43] LC-MS principles. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques* [online]. [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <https://www.omicsonline.org/journal-highlight-images/lcms-principles.jpg>
- [44] Liquid chromatography–mass spectrometry. *Wikipedia* [online]. 2017 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid\\_chromatography%E2%80%93mass\\_spectrometry](https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry)
- [45] HPLC. *Wikipedia* [online]. 2017 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC>
- [46] Agilent GC, HPLC, refurbished, analytical laboratory. *LabMax* [online]. 2017 [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: [www.labmax.ca/gc.php](http://www.labmax.ca/gc.php)
- [47] Plně automatický odběr vzorků Liqueport 2010 CSP44: Přenosný vzorkovač pro čištění odpadních vod a úpravu vody. *Endress and Hauser* [online]. [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <https://www.cz.endress.com/cs/Polni-instrumentace-sita-na-miru/analyza-kapalin/P%C5%99enosn%C3%BD-vzorkova%C4%8D-csp44>

- [48] Guide to Solid Phase Extraction. *Sigma-Aldrich* [online]. 1998 [cit. 2017-05-15].  
Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATC	Anatomicko-terapeuticko-chemická skupina
ČOV	Čistírna odpadních vod
ČR	Česká republika
DAD	Detektor s diodovým polem (Diode Array Detector)
DDD	Definovaná denní dávka
ED	Efektivní dávka (Effective Dose)
EO	Ekvivalentní obyvatel
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
LC	Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LD	Letální dávka (Letal Dose)
LOD	Limit detekce (Limit Of Detection)
LOQ	Limit kvantifikace (Limit Of Quantification)
MIPs	Molekulárně vtištěné polymery (Molecularly Imprinted Polymers)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
NOED	Dávka nevykazující pozorovatelný účinek (No Observable Effect Dose)
OV	Odpadní voda
PNEC	Predikovaná koncentrace nevyvolávající žádný účinek (Predicted No Effect Concentration)
QSAR	Metoda k predikci biologických účinků látek (Quantitative Structure-Activity Relationships)
SPE	Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
UHPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-High Performance Liquid Chromatography)
UV-VIS	Ultrafialová až viditelná oblast spektra (UltraViolet-VISible)
VFU	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)